

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Denisa Vlčková

Vliv biostimulantů na růst a obranné reakce rostlin

Effect of biostimulants on growth and defence reactions in plants

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: RNDr. Kateřina Bělonožníková, Ph.D.

Praha 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne:

Podpis:

Denisa Vlčková

Poděkování:

Chtěla bych tímto poděkovat své vedoucí práce paní prof. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. a své konzultantce paní RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D. za jejich laskavost, trpělivost a odborné rady poskytované v průběhu celé této práce. Rovněž bych chtěla poděkovat paní RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. za její přínosné poznatky. Díky patří také paní RNDr. Petře Inemannové, Ph.D. z Ústavu pro životní prostředí PřF UK za poskytnutí výluhu z vermikompostu a poskytnuté rady v oblasti jeho použití.

Abstrakt

Jako biostimulanty jsou označovány mikroorganismy či látky přírodního původu, které podporují růst a obranyschopnost rostlin vůči abiotickému i biotickému stresu. Mechanismus účinku biostimulantů je stále předmětem výzkumu. V této práci byly studovány dva biostimulanty: fermentované kopřivy (tzv. kopřivová jícha) a výluh z vermikompostu. Oba biostimulanty disponovaly rozpustnými proteiny o nižších relativních molekulových hmotnostech a peptidy, sacharidy, fenolickými látkami i aktivními proteolytickými enzymy a glykosidasami. Po aplikaci biostimulantů na rostliny kukuřice (*Zea mays* L.) se významně nezměnily růstové parametry, ale rostliny vykazovaly vyšší obsah proteinů, fenolických látek, antioxidační kapacitu i aktivitu některých isoform peroxidas. Byl rovněž sledován vliv sucha na růst, metabolismus i antioxidační systém rostlin po aplikaci kopřivové jíchy a výluhu z vermikompostu. Rostliny kukuřice ošetřené biostimulanty a zároveň stresované suchem dokázaly udržet vyšší obsah vody, měly vyšší množství proteinů, fenolických látek a aktivitu glutathionreduktasy než neošetřené stresované kontrolní rostliny. Oba testované biostimulanty ovlivnily metabolismus rostlin kukuřice stresovaných suchem, přičemž pozitivní vliv se projevil více v pěstebním substrátu s nižším obsahem humusu.

Klíčová slova: kopřivová jícha, výluh z vermikompostu, biostimulanty, antioxidanty, proteasy, peroxidasy, glykosidasy, fosfatasy, rostliny kukuřice, abiotický stres, sucho

Abstract

Biostimulants are microorganisms or substances of natural origin that promote plant growth and defence against abiotic and biotic stress. The mechanism of action of biostimulants is still a subject of research. In this work, two biostimulants were studied: fermented nettles and vermicompost leachate. Both biostimulants possessed soluble proteins with lower relative molecular weights and peptides, carbohydrates, phenolic substances as well as active proteolytic enzymes and glycosidases. After application of biostimulants to the maize plants (*Zea mays* L.), growth parameters did not change significantly, but the plants had higher content of proteins and phenolic substances, higher antioxidant capacity and activity of some peroxidase isoforms. The effect of drought on plant growth, metabolism and antioxidant system after application of fermented nettles and vermicompost leachate was also studied. Maize plants under drought stress treated with biostimulants were able to maintain higher water content, showed higher content of proteins, phenolic compounds and higher glutathione reductase activity than untreated stressed control plants. Both tested biostimulants affected the metabolism of drought-stressed maize plants, with the positive effect being more pronounced in the lower-humus soil.

Key words: fermented nettles, vermicompost leachate, biostimulants, antioxidants, proteases, peroxidases, glycosidases, phosphatases, maize plants, abiotic stress, drought

Obsah

1	Teoretický úvod.....	10
1.1	Vliv biostimulantů na obranyschopnost rostlin.....	10
1.1.1	Biostimulanty	12
1.1.2	Proteinové hydrolyzáty	13
1.1.3	Huminové sloučeniny.....	15
1.1.4	Mikroorganismy v biostimulantech	16
1.2	Kopřivová jícha.....	19
1.2.1	Kopřiva dvoudomá.....	19
1.2.2	Stimulační efekt kopřivové jíchy na růst rostlin	20
1.2.3	Kopřivová jícha jako přírodní pesticid.....	21
1.2.4	Vliv jíchy na antioxidační systém rostlin a abiotický stres.....	21
1.3	Výluh z vermikompostu	22
1.3.1	Vermikompostace	22
1.3.2	Zlepšení odpovědi na abiotický stres	24
1.3.3	Fytohormony a huminové kyseliny v produktech vermikompostace	25
1.3.4	Zlepšení odpovědi rostlin na biotický stres po aplikaci vermikompostu.....	26
1.3.5	Fytotoxicita výluhu z vermikompostu.....	27
2	Cíle práce.....	28
3	Materiál a metody.....	29
3.1	Chemikálie	29
3.2	Laboratorní vybavení	31
3.3	Pěstování rostlin	32
3.3.1	Zdroj biostimulantů.....	32
3.3.2	Experimentální provedení	32
3.3.3	Skřízeň rostlin.....	35
3.4	Příprava materiálu pro analýzy	35
3.4.1	Příprava extraktů z listů a kořenů rostlin	35
3.4.2	Příprava roztoků biostimulantů	35
3.4.3	Příprava vzorků z půdy pro analýzy.....	35
3.5	Metody	36
3.5.1	Stanovení obsahu proteinů dle Bradforda	36
3.5.2	Stanovení množství proteinů dle Lowryho	36
3.5.3	Stanovení obsahu fenolických látek.....	36
3.5.4	Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP.....	37

3.5.5	Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH	37
3.5.6	Stanovení celkových sacharidů dle Duboise	38
3.5.7	Stanovení aktivity glutathionreduktasy	38
3.5.8	Stanovení aktivity proteas	39
3.5.9	Stanovení aktivity fosfatas	40
3.5.10	Stanovení aktivity β -1,3-glukanasy, celulasy a chitinyasy	42
3.5.11	Nativní elektroforetická separace	43
3.5.12	Elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS	45
3.5.13	Tricinová elektroforetická separace peptidů	46
3.5.14	Lyofilizace	47
3.5.15	Stanovení relativního obsahu vody v listech	47
3.5.16	Statistické vyhodnocení	47
4	Výsledky	48
4.1	Charakteristika biostimulantů	48
4.1.1	Obsah proteinů v kopřivové jíše a výluhu z vermikompostu	48
4.1.2	Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita v kopřivové jíše a výluhu z vermikompostu	50
4.1.3	Aktivita β -1,3-glukanasy, celulasy a chitinyasy v kopřivové jíše a výluhu z vermikompostu	51
4.1.4	Aktivita proteas v kopřivové jíše a výluhu z vermikompostu	51
4.2	Vliv biostimulantů na rostliny kukuřice experimentu 1	52
4.2.1	Charakterizace rostlin kukuřice	52
4.2.2	Obsah proteinů v rostlinách kukuřice ošetřených biostimulanty	54
4.2.3	Celkový obsah sacharidů v rostlinách ošetřených biostimulanty	54
4.2.4	Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita v rostlinách ošetřených biostimulanty	55
4.2.5	Aktivita vybraných enzymů v rostlinách ošetřených biostimulanty	56
4.3	Vliv biostimulantů na rostliny kukuřice vystavené suchu v experimentu 2	60
4.3.1	Charakterizace rostlin kukuřice vystavených suchu	60
4.3.2	Obsah proteinů v rostlinách kukuřice vystavených suchu	62
4.3.3	Obsahu fenolických látek a antioxidační kapacita v rostlinách kukuřice vystavených suchu	63
4.3.4	Aktivita vybraných enzymů v rostlinách kukuřice vystavených suchu	64
4.3.5	Aktivita proteas v rostlinách kukuřice vystavených suchu	66
4.4	Vliv biostimulantů na rostliny kukuřice vystavených suchu v experimentu 3	71
4.4.1	Charakterizace rostlin kukuřice vystavených suchu	71

4.4.2	Obsah proteinů v rostlinách kukuřice vystavených suchu	73
4.4.3	Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita v rostlinách kukuřice vystavených suchu.....	74
4.4.4	Aktivita vybraných enzymů v rostlinách kukuřice vystavených suchu	75
5	Diskuze.....	82
5.1	Charakterizace biostimulantů	82
5.2	Vliv biostimulantů na růst a metabolismus rostlin kukuřice	83
5.3	Vliv biostimulantů na rostliny kukuřice vystavené suchu	84
6	Závěr.....	86

Seznam zkratek

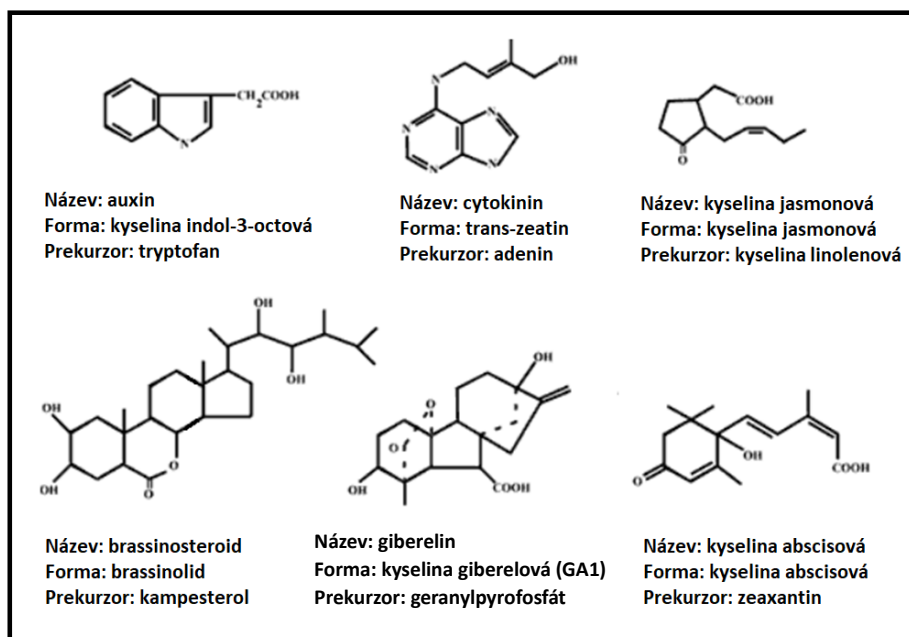
- % (v/v) objemové procento
- % (w/v) hmotnostní procento
- ACC 1-aminocyclopropane-1-karboxylát
- AMF arbuskulárně mykorrhizní houby (z aj. arbuscular mycorrhizal fungi)
- AMP 2-amino-2-methyl-1-propanol hydrochlorid
- BSA hovězí sérový albumin (z aj. bovine serum albumine)
- CDNB 1-chloro-2,4,dinitrobenzen
- DAB 3,3-diaminobenzidin
- DPPH 2,2-diphenyl-1-pikrylhydrazyl
- DTT 1,4-dithiothreitol
- EDTA ethylendiamintetraoctandisodný dihydrát
- ekv. ekvivalent
- FRAP antioxidační síla schopná redukovat Fe^{3+} ionty (z aj. ferric ion reducing antioxidant power)
- FRET fluorescenční rezonační přenos energie (z aj. fluorescence resonance energy transfer)
- HSP proteiny teplotního šoku (z aj. heat shock proteins)
- ISR indukovaná systémová rezistence (z aj. induced systemic resistance)
- LEA proteiny s ochranou funkcí proti agregaci proteinů (z aj. late embryogenesis abundant proteins)
- MBTH 3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazonhydrochlorid hydrát
- MOPS 3-morpholinopropan-1-sulfonová kyselina
- NADPH nikotinamidadeninukleotid fosfát redukovaný
- NBT nitroblue tetrazolium chlorid
- PAMP molekulární vzory asociované s patogeny (z aj. pathogen-associated molecular patterns)
- PGPR rhizobakterie podporující růst rostlin (z aj. plant growth promoting rhizobacteria)
- PMS fenasin methosulfát (z aj. phenazine methosulphate)
- PNPP p-nitrofenylfosfát
- PR proteiny spojené s odpovědí na patogeny (z aj. pathogen response)
- PVP polyvinylpolypyrrolidon
- RFU relativní jednotky fluorescence (z aj. relative fluorescence units)
- RWC relativní obsah vody (z aj. relative water content)
- SAR získaná systémová rezistence (z aj. systemic acquired resistance)
- SDS dodecylsírán sodný (z aj. sodium dodecyl sulphate)
- TEMED N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
- TPTZ 2,4,6-Tris(2-pyridyl-s-triazin)
- Tris tris(hydroxymethyl)aminomethan
- VOC těkavé organické sloučeniny (z aj. volatile organic compounds)

1 Teoretický úvod

1.1 Vliv biostimulantů na obranyschopnost rostlin

Rostliny, jakožto usedlé organismy, nemají možnost vyhnout se působení vnějšího stresu. S ohledem na to si vytvořily obranný systém, mobilizovaný signalizací zprostředkovanou například fytohormony nebo reaktivními formami kyslíku, které jsou vlivem stresu nadprodukovány a samy vyvolávají oxidační stres. Tato signalizace obecně způsobuje aktivaci antioxidačního systému na úrovni nízkomolekulárních antioxidantů, antioxidačních enzymů a osmoprotektantů [1]. V případě biotických stresů může docházet také ke zvýšené syntéze fytoalexinů a PR (z aj. pathogen response) proteinů, navození získané systémové rezistence (SAR; z aj. systemic acquired resistance – signalizace spojená s vysláním informací o lokálním biotickém stresu do vzdálených částí rostliny) nebo hypersenzitivní odpovědi (obdoba apoptózy) [2,3].

Jak již bylo zmíněno, rostlinné hormony se významně podílejí na reakci na vnější stresory. Hormony jako auxiny, cytokininy, gibereliny a brassinostreoidy figurují v řadě biologických procesů souvisejících nejen s vnějším stresem, ale také s růstem listů a kořenů, kvetením, vývojem plodů a klíčením semen. Jiné fytohormony jako například kyselina abscisová jsou spojovány přímo s odezvou na stres. Kyselina abscisová je zapojena především v signalizaci spojovanou s odezvou na stres vyvolaný dehydratací (sucho, mráz, zasolení). Mezi její účinky patří mimo jiné regulace transpirace nebo stimulace obranných drah vedoucí k transkripci LEA (z aj. late embryogenesis abundant) proteinů nebo HSP (z aj. heat shock proteins). Mezi další stresové hormony patří například kyselina salicylová a kyselina jasmonová, které se podílejí na odpovědi na biotický stres [1,4,5]. Strukturu těchto hormonů ilustruje Obr. 1 na následující straně.



Obr. 1 Přehled vybraných fytohormonů spojovaných se stresovou odpovědí rostlin. Obrázek ilustruje charakteristické struktury těchto rostlinných hormonů.

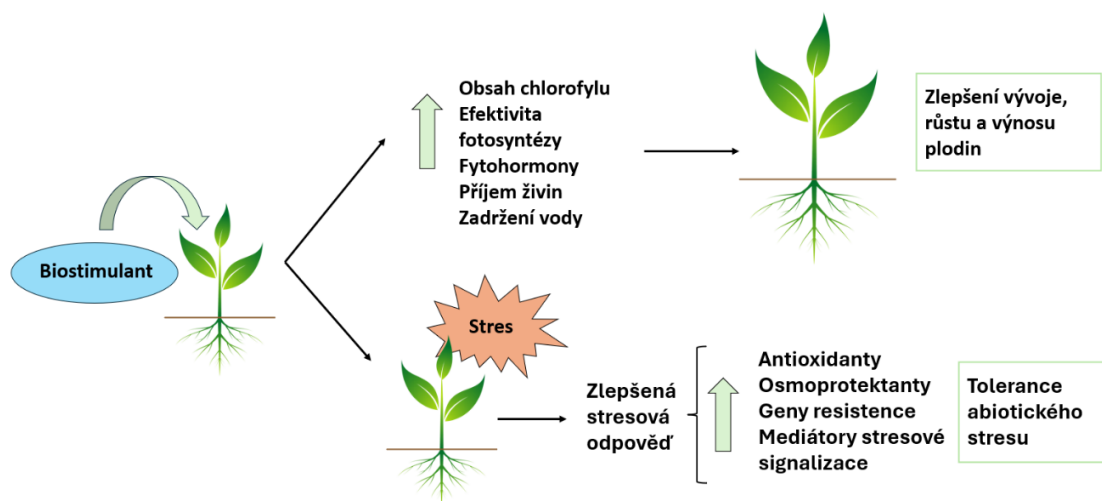
Tolerance stresu úzce souvisí nejen s vitalitou rostlin a půdních mikroorganismů v oblasti rhizosféry, ale i s předešlými zkušenostmi s daným typem stresu či případnými dlouhodobými adaptacemi daného rostlinného druhu. Jednou z možností zvýšení tolerance je setkání se stresem. Aby došlo k navýšení stresové tolerance je třeba, aby se jednalo o méně intenzivní stres krátkodobějšího trvání. Toto přizpůsobení ale může mít za následek pokles rostlinné biomasy, vzhledem k tomu, že vede ke zvýšenému výdeji energie související s preventivní syntézou antioxidantů [6]. Další možnou přípravu na stres představuje také tzv. priming, při kterém jsou semena, případně sazenice rostlin vystavovány působení chemických a biologických látek nebo fyzikálních vlivů po určitou dobu. Rostliny ošetřené technikami primingu jsou pak dlouhodobě odolnější, aniž by došlo ke snížení vitality dospělých jedinců. Ačkoliv mechanismy, kterými priming obranyschopnost posiluje nejsou zcela popsány uvažuje se o podpoře rozvoje stresové paměti na úrovni epigenetických změn DNA nebo akumulace transkripčních faktorů příslušných stresových odpovědí [7,8].

Zvyšováním odolnosti vůči stresu charakteristickému pro biotický stres je tzv. indukovaná systémová rezistence (ISR; z aj. induced system resistance). Jedná se o imunizaci rostlin vystavením například látkám rostlinného původu (kyselina salicylová), látkám z buněčných stěn hub (např. chitosan), bakteriálními složkám (např. lipopolysacharidy) a roli v této stresové toleranci hrají také některé půdní mikroorganismy jako rhizobakterie podporující růst rostlin (PGPR; z aj. plant growth promoting rhizobacteria), které mohou rostliny vystavit například

tzv. PAMP vzorům (z aj. pathogen-associated molecular patterns), pomocí kterých mohou rozpoznávat patogenní bakterie v případě napadení [3]. Nepřímým způsobem tolerance rostlin vůči stresu je interakce s prospěšnými půdními mikroorganismy jako jsou PGPR nebo arbuskulárně mykorrhizní houby (AMF; z aj. arbuscular mycorrhizal fungi). Ty mohou rostlinám napomáhat nejen s lepší dostupností živin (mineralizace živin, fixace N₂, solubilizace fosforu, produkce sideroforů), ale samy jsou také producenty fytohormonů nebo těkavých organických látek (VOC; z aj. volatile organic compound). VOC mohou volně vstupovat do buněk kořenů nebo listů a jsou využívány ke vzájemné komunikaci bakterií a rostlin, přičemž jsou vhodné i na delší vzdálenosti. Dalším mechanismem mezidruhové komunikace je také vylučování kořenových exudátů. Ty jsou dle potřeby rostlin sekretovány do rhizosféry a jejich složení se mění jak v reakci na její aktuální stav, a tudíž i v důsledku vystavení stresu [9,10].

1.1.1 Biostimulanty

Jedněmi z prostředků, kterým je přikládána schopnost posilovat antioxidační systém dospělých i mladých rostlin a semen jsou přípravky označované jako biostimulanty. Biostimulanty jsou souhrnně popisované jako směsi látek nebo mikroorganismů, které mají schopnost podporovat růst a obranyschopnost rostlin. Nejedná se však o hnojiva [11]. Mohou být využity pro aplikaci na listy, do půdy nebo k ošetření semen. Přestože se složení různých biostimulantů výrazně liší, jejich účinky na rostliny a dosud zjištěné fyziologické změny jsou často velmi podobné. Jako jedno z možných vysvětlení se nabízí schopnost ovlivňovat rovnováhu fytohormonů. Některé společné účinky biostimulantů ilustruje následující Obr. 2. Mezi biostimulanty jsou obecně řazeny přípravky z mořských řas a rostlinných extraktů, pyrolyzované materiály, proteinové hydrolyzáty, huminové látky, PGPR nebo AMF [11–14].



Obr. 2 Obecné účinky biostimulantů na rostliny. Biostimulanty pozitivně ovlivňují růst a vývoj rostlin, ale vyvolávají také zlepšenou odezvu na abiotický a někdy i biotický stres. Převzato a upraveno z [14].

Řada těchto biostimulantů je také komerčně dostupná a jsou využívány jak v zahrádkářském, tak zemědělském odvětví po celém světě. Příkladem biostimulantů volně prodejných v ČR jsou rostlinné stimulanty Vermaktiv od firmy Enzymix nebo biostimulanty Inporo od firmy AgroBioOpava. Dle bezpečnostního listu výrobce je přípravek Vermaktiv Stimul získaný extrakcí z vermikompostu složen z roztoku enzymů (lipas, proteas, amylas a hemicelulas), aminokyselin, cytokininů, auxinů, stopových prvků a dalších látek. Výrobce uvádí, že tento produkt podporuje zakořeňování, růst, kvetení a obranyschopnost rostlin a může být díky svému složení používán v ekologickém zemědělství ve formě postřiku [15]. Vedle toho přípravek Inporo Pro Mix je založen na přítomnosti prospěšných mikrobiálních druhů a obsahuje bakterie druhu *Azotobacter chroococcum*, *Polyangium cellulosum*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium meliloti*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces cellulosae* a houby *Trichoderma harzianum* a *Trichoderma viride*. Jako účinky použití tohoto přípravku jsou taktéž uvedeny podpora růstu kořenů a stonků, podpora kvetení a zrání plodů, podpora příjmu a dostupnosti živin a zvýšení odolnosti proti abiotickým stresům a některým onemocněním [16].

1.1.2 Proteinové hydrolyzáty

Proteinové hydrolyzáty jsou typem biostimulantů připravované chemickou či enzymovou hydrolyzou živočišných i rostlinných zdrojů proteinů. Hydrolyzáty živočišného původu tvoří asi 90 % všech těchto produktů. Mohou být vyráběny hydrolyzou odpadních produktů, jako jsou zbytky ryb, peří a vaziva, nebo například hydrolyzou mléčné bílkoviny kaseinu. Tyto hydrolyzáty obsahují v sušině 9–16 % dusíku a představují bohatý zdroj aminokyselin a peptidů, jejichž poměr závisí na způsobu přípravy. Proteinové hydrolyzáty mohou být připravovány alkalickou, častěji však kyselou hydrolyzou při teplotách a tlacích přesahujících 120 °C a 220 Pa [11,17]. Takto připravený finální produkt obsahuje především volné aminokyseliny. Vedle toho hydrolyzáty připravené působením enzymů obsahují větší podíl peptidů v řádu stovek až tisíců Daltonů. Některé přítomné peptidy rostlinného původu vykazují také bioaktivní účinky. Izolovány byly například systeminy indukující obranné signální dráhy nebo fyto-sulfokiny regulující dediferenciaci. Větší množství bioaktivních peptidů často obsahují hydrolyzáty rostlinného původu typicky připravované z bobovitých rostlin jako je sója luštinatá. Na rozdíl od hydrolyzátů živočišného původu obsahují typicky také fenolické látky a fytohormony [11,17,18].

Bez ohledu na přítomnost bioaktivních látek je samotná směs peptidů a aminokyselin ideálním zdrojem dusíku, uhlíku a případně i fosforu jak pro bakterie obývající rhizosféru a fylosféru, tak

i pro rostliny [18]. Například studie Jílkové et al. z roku 2021 zaměřující se na výzkum efektů hydrolyzátů proteinů na půdu uvádí, že zvýšený přísun dusíku po aplikaci proteinového hydrolyzátu přetrvával po dobu několika měsíců [19]. Rostliny jsou schopny aminokyseliny absorbovat především kořeny z půdy prostřednictvím aminokyselinových transportérů. Membránové transportéry byly identifikovány také v případě transportu peptidů [20,21].

Některé aminokyseliny mají sami o sobě pozitivní vliv na toleranci stresu. Například osmoprotektant prolin je akumulován v reakci na stres a účastní se stresové signalizace. Také glycin je v rámci sloučeniny glycin-betainu spojován osmoprotektivními účinky, významnými zejména při vodních stresech (zasolení, sucho, chlad) [12]. Kromě toho je glycin spolu s cysteinem a kyselinou glutamovou součástí tripeptidu glutathionu. Ten se nejen podílí na regeneraci kyseliny askorbové, hlavního nízkomolekulárního antioxidantu zodpovědného za zhasení volných radikálů, ale sám také působí jako zhášec radikálů. Glutathion se také volně nebo ve formě svých polymerů fytochelatinů účastní vychytávání iontů kovů spojených s katalýzou radikálových reakcí (např. Fe^{2+} , Cu^{2+}) a stresem zasolením (např. Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+}). Na zmírňování účinků solného stresu se kromě nich účastní také další proteiny bohaté na cystein – metalothioneiny [22,23]. Jistý význam ve zmírňování dopadu stresu by mohl mít také tryptofan. Tento prekurzor rostlinného hormonu auxinu by mohl stimulovat jeho syntézu v rostlinách i půdních bakteriích a podílet se tak na zlepšování stresové tolerance [18]. V neposlední řadě jsou hydrolyzáty proteinů pro rostliny zdrojem aminokyselin asparaginu a glutaminu. Tyto aminokyseliny jsou hlavními transportovanými formami dusíku a účastní se tak i jeho mobilizace, která je v případě některých stresů pozorována [24].

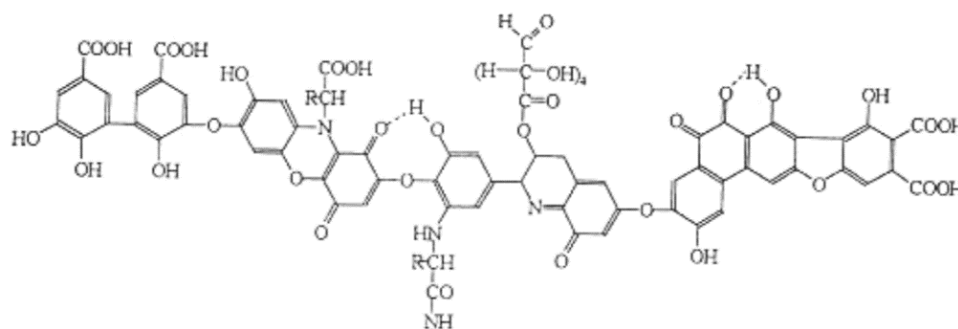
Z doposud popsáných účinků proteinových hydrolyzátů na rostliny bylo zjištěno celkové zmírnění účinků abiotických stresů. V rostlinách vystavených stresu zasolení bylo například pozorováno zvýšení aktivity nitrátoreduktasy a glutaminsynthetasy spolu se zvýšením syntézy chlorofylu. Kromě toho byla zaznamenána zvýšená exprese fenylalaninamoniumlyasy, klíčového enzymu syntézy fenolických látek. Pozorován byl také nárůst hladin karotenoidů nebo kyseliny salicylové. Vlivem těchto změn došlo k posílení antioxidantního systému a navození osmoregulace [25–27]. Rostliny vystavené stresu suchem vykazovaly zvýšenou aktivitu antioxidantních enzymů (askorbátperoxidasa, superoxididismutasa) a rovněž bylo patrné navýšení syntézy sekundárních metabolitů. V případě stresu indukovaného vysokými teplotami byl pozorován nárůst exprese HSP vedoucí ke stabilizaci buněčných membrán a prevenci vzniku proteinových agregátů. Zjištěn byl také nárůst hladin fotosyntetických pigmentů, který napomohl ve zlepšení efektivity fotosyntézy [25,28]. Zaznamenána byla ale také ochranná

či preventivní funkce vůči biotickým stresům. Příkladem může být snížení symptomů onemocnění rostlin vinné révy napadených plísní *Bortrytis cinera* [11].

1.1.3 Huminové sloučeniny

Huminové sloučeniny je široké označení pro skupinu organických látek vznikajících rozkladnými procesy biomasy, které tvoří hlavní část organické hmoty v půdě. Kromě půdy se huminové sloučeniny nacházejí například v sedimentech vod, v uhlí a rašelině nebo v produktech kompostování. Vzhledem k jejich nejasné definici jsou děleny na, fulvokyseliny rozpustné ve vodě, huminové kyseliny rozpustné v neutrálním až zásaditém pH a huminy, které jsou ve vodě zcela nerozpustné [29,30]. Ačkoliv proces humifikace nebyl doposud zcela objasněn, huminové látky pravděpodobně vznikají kombinací depolymerace větších biopolymerů a polymerací menších molekul uvolněných jejich kompletním rozkladem. Předpokládá se také alespoň částečný radikálový charakter mechanismu jejich vzniku. Jsou typicky složeny z aromatických polymerních kruhů substituovaných velkým množstvím skupin, z nichž nejvýznamnější jsou skupiny karboxylové a hydroxylové. Jako prekurzory huminových látek se uvádějí například ligniny, taniny, terpenoidy, steroly, celulóza, lipidy a peptidy [30–32].

Z hlediska biostimulantů jsou za nejvýznamnější frakci považovány huminové kyseliny. Ty jsou v případě komerčních zdrojů často extrahovány z hnědého nebo černého uhlí a stále jsou vyvíjeny metody extrakce poskytující vyšší výtěžek s velkým množstvím karboxylových a hydroxylových skupin [29]. Velmi rozsáhlé je v případě huminových kyselin také rozpětí molekulové hmotnosti, kdy jednotlivé polymery mohou dosahovat velikosti 2–100 kDa [33]. Izolované frakce proto obsahují jak nízkomolekulární, tak i vysokomolekulární polymery. Ačkoliv jejich podíl není definován, je stejně jako chemická struktura huminových kyselin závislý na zdroji, ze kterého jsou izolovány a na způsobu extrakce [29]. Možnou navrhovanou strukturu ilustruje následující Obr. 3.



Obr. 3 Příklad možné struktury obsažené v huminových kyselinách. Převzato a upraveno z [31].

Mezi nejvýznamnější vlastnosti huminových kyselin patří: schopnost dlouhodobě odolávat degradaci, amfifilní charakter, schopnost zhášet volné radikály spojovaná s přítomností fenolických a chinoidních látek [30,32]. Huminové kyseliny jsou obvykle aplikovány ve formě závlivky do půdy, ačkoliv možná je i aplikace na listy. Předpokládá se, že polymery s vyšší molekulovou hmotností mohou zodpovídat za aktivaci H^+ ATPasy na plasmatické membráně buněk kořenů. Nízkomolekulární polymery, které by mohly být vstřebávány kořeny v kontrastu s živinami, ovlivňují rostlinný metabolismus způsobem podobným fytohormonům auxinům, giberelinům a cytokininům. Účinky huminových kyselin na rostliny jsou spojovány také s jejich schopností příznivého ovlivnění půdního mikrobiomu, a to například přilákáním prospěšných mikroorganismů nebo zpřístupněním a navázáním živin. Schopnost zachycovat nejen živiny, ale také ionty těžkých kovů je přisuzována zejména právě karboxylovým a hydroxylovým skupinám deprotonovaným v neutrálním a alkalickém prostředí. Amfifilní charakter pak huminovým kyselinám propůjčuje schopnost vytvářet micelární struktury, což je využíváno nejen v zemědělství ale i ve farmaceutickém odvětví nebo v čistírnách odpadních vod [11,29].

Přesný mechanismus působení huminových kyselin na antioxidační systém rostlin není stejně jako u ostatních biostimulantů zcela zřejmý. Při vystavení experimentálních rostlin suchu byla po aplikaci huminových kyselin pozorována řada účinků. Došlo například k nárůstu aktivit antioxidačních enzymů superoxidodismutasy, katalasy, glutathionreduktasy a celkových peroxidas [34]. Pozorováno bylo zvýšení hladin fytohormonu kyseliny abscisové, spojované se signalizací vyvolanou vodním stresem nebo také zvýšení obsahu anthokyanů a chlorofylu. Zaznamenáno bylo zvýšení relativního obsahu vody v listech a zvýšení vodního potenciálu [35,36]. Podobné účinky byly pozorovány také u rostlin vystavených stresu zasolením, spolu se stimulací sekundárního metabolismu, metabolismu dusíku a zvýšení aktivity membránové H^+ ATPasy spojované se zlepšením příjmu živin kořeny [12,37]. Pozitivní účinky huminových kyselin byly pozorovány také ve spojení se stresem vyvolaným vysokými teplotami, kdy byla pozorována zvýšená exprese HSP a stimulace metabolismu dusíku prostřednictvím aktivace glutaminsynthetasy a glutamát-synthasy [38]. Je však nutné podotknout, že některé studie neuvádějí žádné zjištěné změny spojené s aplikací huminových kyselin [29].

1.1.4 Mikroorganismy v biostimulantech

Dle regulace Evropské Unie 2019/1009 jsou za mikroorganismy s biostimulačními účinky považovány AMF druhy kmene *Glomeromycota* a bakteriální rody *Azobacter*, *Rhizobium* a *Azospirillum*. Tento výčet však ani zdaleka nepokrývá množství rostlinám prospěšných

bakteriálních kmenů, jejichž biostimulační účinky byly dosud popsány. Skupina PGPR dále zahrnuje bakteriální kmeny *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* a *Bacteroidetes* a řadu bakteriálních rodů jako jsou například *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella* a *Pseudomonas* [39]. Přičemž PGPR obecně tvoří největší podíl půdních bakterií v oblasti rhizosféry s největším zastoupením kmenů *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* a do menší míry *Firmicutes*. Zatímco zastoupení konkrétní kmenů i druhů hub je více variabilní dle místa růstu a druhu rostliny. Bakterie skupiny PGPR pak nejspíše tvoří také významný podíl kmenů osidlujících fylosféru. V rostlinách *Arabidopsis thaliana* byly jako nejčtenější identifikovány kmeny *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* a *Sphingomonas* [18,40]. Kromě PGPR a AMF jsou za biostimulanty považovány mikroorganismy s biopesticidní aktivitou, které se významně překrývají se skupinou PGPR, ale patří sem například také endofytické houby rodu *Trichoderma* a *Sebacinales* s antifungicidními účinky. Mezi účinky spojované s biopesticidní aktivitou bakterií lze zařadit, produkci lytických enzymů a určitých VOC, tvorbu biofilmu, indukci SAR nebo zvýšení produkce PR proteinů u rostlin (například hydrolytické enzymy jako chitinasy nebo β -1,3-glukanasy) [11].

Skupina AMF je známá pro svůj alespoň částečný symbiotický vztah s rostlinami. Při tomto typu symbiózy, který byl pozorován asi u 80 % rostlinných druhů, jsou kořeny rostlin kolonizovány hyfami hub, zatímco houby od rostlin čerpají asimiláty fotosyntézy. Hyfy hub zvětšují povrch kořenového systému až 40násobně a pomáhají tak rostlinám s příjmem vody a živin. Známé jsou pro zlepšení schopnosti rostlin přijímat fosfor, hydrolyzou jeho organických sloučenin fosfatasami. Kromě toho také zasahují do fytohormonální rovnováhy rostlin a vyvolávají změny v sekundárním metabolismu. Nejčastěji využívané AMF v biostimulantech jsou rody *Rhizophagus* a *Funneliform*. Pro konkrétní druhy rostlin je však důležité vybrat vhodný mykorrhizní druh. Možná je také inokulace přípravků obsahující kombinaci AMF a PGPR [41,42].

Ačkoliv pozitivní vliv AMF na rostliny ohrožené abiotickým stresem nelze popřít, je nutné zmínit křehké fungování této rovnováhy, kterou může snadno narušit zvýšené použití anorganických hnojiv nebo aplikace chemických pesticidů. Biostimulační účinky AMF jsou proto patrné především při použití v ekologickém zemědělství [42]. Ve stresových podmínkách vyvolaných suchem byla pozorována řada příznivých účinků AMF na antioxidační systém a metabolismus ošetřených rostlin. Pozorováno bylo například zvýšení aktivity 1-aminocyklopropan-1-karboxylát(ACC)deaminasy a antioxidačních enzymů, indukce

akumulace kompatibilních solutů, zvýšení obsahu fenolických látek, nárůst hladin auxinů a gibberelinů, udržení obsahu vody v listech, zvýšení příjmu živin, nárůst aktivity nitrátreduktasy a také zvýšení obsahu chlorofylu spojené s nárůstem fotosyntetické aktivity. Podobné změny byly zaznamenány i v případě působení dalších abiotických stresorů [43,44].

Rostlinám prospěšné bakterie, známé jako PGPR, zahrnují jak volně žijící půdní druhy, tak částečně symbiotické bakterie, které kolonizují především kořenový systém rostlin. Výčet jejich potenciálně prospěšných vlastností pro rostliny zahrnuje, podobně jako u jiných biostimulantů, zlepšení příjmu živin, fytohormonální interference a ochranu před biotickým a abiotickým stresem. Tyto účinky jsou primárně spojeny s látkami, které PGPR produkují, a to buď v kontextu komunikace s rostlinami, nebo jako důsledek jejich přirozených procesů a vlastní obrany proti stresovým faktorům. Některé PGPR mohou v závislosti na stresové situaci a druhu rostliny produkovat různé fytohormony – typicky auxiny, gibbereliny, cytokininy a kyselinu abscisovou. Tato schopnost pomáhá příznivě ovlivňovat hormonální regulaci a s ní spojenou odolnost vůči stresovým podmínkám. Konkrétně s tolerancí stresu navozeného suchem pomáhají rostlinám také bakteriemi vylučované exopolysacharidy, jejichž produkce při nedostatku vody v půdě roste. Vzniklý biofilm zabraňuje ztrátám vody a zlepšuje podmínky pro růst kořenů. Kromě toho bakterie vystavené suchu vykazují nárůst aktivity antioxidantních enzymů, které v blízkosti kořenového systému napomáhají s odstraňováním reaktivních forem kyslíku.

Také produkce VOC hraje roli ve zvládnání stresu vyvolaném suchem a zasolením [39,45]. Například bakterie *Rahnella aqualitis* JZ-GX1 je producentem 2,3-butandiolu, kterým byla ošetřena semena rostlin následně vystavená solnému stresu. Takto ošetřená semena vyklíčila v rostliny s rozvětvenějším kořenovým systémem, což výrazně zlepšilo schopnost příjmu vody a živin v osmoticky nevyvážených podmínkách. Tato těkavá látka rovněž stimulovala aktivitu antioxidantních enzymů [9]. V reakci na osmotické stresy mohou bakterie vylučovat VOC schopné u rostlin regulovat syntézu osmoprotektantů. Prospěšnými bakteriemi mohou být produkovány také různé kompatibilní soluty, které mají rostliny možnost odčerpávat. Ve spojení se stresem suchem a zasolením byla často pozorovaná také zvýšená aktivita ACCdeaminasy. Tento enzym, rovněž produkováný některými PGPR, katalyzuje degradaci prekurzoru ethylenu, čímž je snižováno jeho celkové množství v rostlině. Nízké hladiny ethylenu jsou pak spojovány s tolerancí abiotických vodních stresů, ale i stresu biotického původu, kde je ethylen mimo jiné mediátorem signalizace napojené na kyselinu jasmonovou [39,44,46].

1.2 Kopřivová jícha

Kopřivová jícha je fermentovaný preparát rostlinného původu, který je už po celá staletí využíván pro své pozitivní účinky na růst a zdraví rostlin. Výroba kopřivové jíchy, zaznamenaná v mnoha zemích po celé Evropě, sestává z ponoření rostlin kopřiv do vody a jejich následného kvašení po dobu 2–4 týdnů. Použity mohou být celé rostliny, ale častá je také příprava pouze z listů. Během fermentačního procesu je doporučováno rostlinný materiál pravidelně míchat a ponechávat přípravnou nádobu bez víka. Hotová jícha je charakteristická tmavě zelenou barvou a absencí pěny. Pro urychlení fermentačního procesu je možné kopřivy před ponořením do vody nasekat. Kopřivová jícha je obvykle připravována naplněním nádoby kopřivami ze tří čtvrtin a následným zalitím vodou, tak aby byly kopřivy zcela ponořeny. Pro její přípravu není vhodné používat rostliny v květu nebo rostliny již tvořící semena. Po přefiltrování a zředění vodou v poměru 1 : 9, může být jícha aplikována na rostliny ve fázi růstu, jak ve formě závlivky, tak formou postřiku na listy [47–49].

1.2.1 Kopřiva dvoudomá

Kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) je trvalá bylina z čeledi kopřivovitých, rostoucí po celém světě, typicky na vlhkých místech s vysokým obsahem dusíku. Je známa nejen pro svoji schopnost vylučovat obrannou tekutinu způsobující podráždění pokožky, ale také pro své léčivé účinky, na nichž se zřejmě podílí celá škála sekundárních metabolitů. Popisované účinky extraktů z listů kopřiv, jako jsou například antioxidační či protizánětlivé vlastnosti, jsou lidmi využívány také při prevenci a podpůrné léčbě některých zdravotních komplikací (kardiovaskulární onemocnění, onemocnění močového ústrojí) [50–52]. Pro svůj vysoký obsah živin a vitamínů se spařené či sušené listy kopřiv využívají také jako přísada do jídel či krmiv domácích zvířat [53].

V sušině listů kopřiv bylo z celkové hmotnosti identifikováno 30 % proteinů, obsahujících veškeré esenciální aminokyseliny a 20 % minerálních látek, kde byly bohatě zastoupeny sloučeniny fosforu, dusíku, železa, zinku, draslíku a hořčíku. Dále byla identifikována řada mastných kyselin, ochranných pigmentů a chlorofylu a množství sekundárních metabolitů, a to především polyfenolických látek s širším zastoupením flavonoidů a lignanů. Kromě toho byla v listech kopřiv zjištěna také vysoká koncentrace vitamínů C, A a K. V trichomech rostlin kopřiv byla rovněž identifikována skupina látek zahrnující kyselinu mravenčí, acetylcholin, serotonin a histamin [51,53]. Vzhledem k novým zjištěním u příbuzné kopřivy *Urtica ferox*, by

kopřiva dvoudomá v trichomové tekutině, mohla v nízkém množství obsahovat také toxické peptidy – neurotoxický urticatoxin a cytotoxický urticathionin [54].

1.2.2 Stimulační efekt kopřivové jíchy na růst rostlin

Jak již bylo zmíněno, kopřivová jícha je známá zejména pro stimulační vliv na růst rostlin. Z tohoto důvodu je v současné době využívána v zahrádkářství, ale také jako přípravek ekologického zemědělství. Kopřivová jícha tak v kombinaci s dalšími jíchami rostlinného původu a produkty kompostace či vermikompostace může představovat jednu z alternativ k použití anorganických hnojiv. Její využití bylo také zaznamenáno v případě tzv. korektivního hnojení, kterého se uplatňuje v půdách, poškozených nadměrným užíváním pesticidů nebo i anorganických hnojiv [49].

Za efektem, kterým kopřivová jícha působí na rostliny zřejmě stojí komplexní mechanismus více účinků. Jedním z nich je se vši pravděpodobností vysoký obsah dobře dostupných živin ať už pro rostliny samotné, tak i pro půdní mikrobiom. Podle provedených analýz se kopřivová jícha ukázala být významným zdrojem makro i mikroprvků, a to především dusíku, hořčíku, železa a bóru [47,55]. V kopřivové jíše připravené tradičním způsobem bylo ve studii autorů Maričić et al. z roku 2021 zjištěno ze všech dusíkatých látek přítomných nejvyšší zastoupení amonných iontů [49]. Ačkoliv amonné ionty nejsou na rozdíl od dusičnanů preferovaným zdrojem dusíkatých látek rostlin, jedná se o snadno dostupný zdroj dusíku právě pro organismy půdní mikroflóry [56]. Dle studie autorů Garmendia et al. z roku 2018, byl za významný faktor stimulace rostlin označen také nízký poměr C : N kopřivové jíchy [57]. Kromě zlepšení příjmu dusíkatých látek, se některé zdroje také zmiňují o zlepšení příjmu fosforu rostlinami. V experimentu autorů Maričić et al. z roku 2022 bylo toto zlepšení po aplikaci kopřivové jíchy pozorováno. Současně byl také zjištěn nárůst aktivity alkalické fosfatasy v půdě. Dalšími pozorovanými efekty bylo zvýšení dostupnosti draslíku v půdě nebo nárůst hodnot půdní respirace [58]. Zmíněný nárůst půdní respirace by mohl být považován za známku rozšíření půdního mikrobiomu, celkového zvýšení efektivity rozkladných procesů a všeobecného zlepšení dostupnosti živin po aplikaci kopřivové jíchy [59]. Jedním z dalších navržených vlivů na stimulaci růstu by mohla být také přítomnost rostlinných hormonů. Ta byla rovněž navržena autory experimentu výše (Maričić et al.), sledujícího vliv jíchy na růst sazenic zelí a salátu. Jeho autoři se domnívají, že by pozitivní účinky na stimulaci růstu testovaných rostlin mohly souviset s přítomností auxinu v kopřivové jíše [58]. Tento návrh je podporován, také zjištěním přítomnosti řady fytohormonů v jiných lépe identifikovaných biostimulantech [60].

1.2.3 Kopřivová jícha jako přírodní pesticid

Kromě stimulace růstu je kopřivová jícha účinná také při boji s biotickým stresem, kdy přispívá k posílení obranyschopnosti rostlin proti řadě škůdců. Pozorovány byly účinky proti některým onemocněním bakteriálního (*Erwinia sp.*) či houbového původu (*Erysiphaceae g.*), ale také účinky nematocidní (*Helicotylenchus sp.*) či insekticidní (*Tetranychus sp.*) [47,53,55]. Z těchto důvodů je kopřivová jícha spojována s výrobou domácích pesticidů, jejichž příprava má rovněž dlouholetou tradici. Jedním z navrhovaných účinků kopřivové jíchy, obzvláště při aplikaci na listy, by mohlo být zvětšení tloušťky epidermis a výsledné zlepšení obranyschopnosti před poškozením patogeny [57]. Jedno z dalších vysvětlení zvýšení obranyschopnosti rostlin proti patogenům by mohlo také souviset s příjmem kyseliny salicylové z jíchy [55]. Tento fytohormon hraje významnou roli například v lokálních obranných reakcích proti patogenům a v signalizaci biotického stresu. Vedle toho autoři Bhusal et al. ve studii z roku 2022 uvádí přítomnost lytické aktivity proti 16 častým fytopatogenům u tradičně připravené kopřivové jíchy a čtyř komerčních přípravků na stejné bázi. Tato studie dále odhalila, přítomnost bakteriofágů rodu *Ghunavirus*. Dříve objevené bakteriofágy tohoto rodu byly nalezeny v různých vzorcích životního prostředí (především závlahová voda, ale také půda nebo debris rostlinného původu) a všechny byly izolovány z bakterií rodu *Pseudomonas*. Je tedy možné, že se fágy v bakteriích rodu *Pseudomonas* mohou do kopřivové jíchy dostat z prostředí růstu kopřiv [47]. Ačkoliv kopřivová jícha není potvrzeným přípravkem proti biotickému stresu, její použití může být účinným preventivním opatřením proti řadě fytopatogenů a může přispívat ke zvládnutí již probíhající infekce [55].

1.2.4 Vliv jíchy na antioxidační systém rostlin a abiotický stres

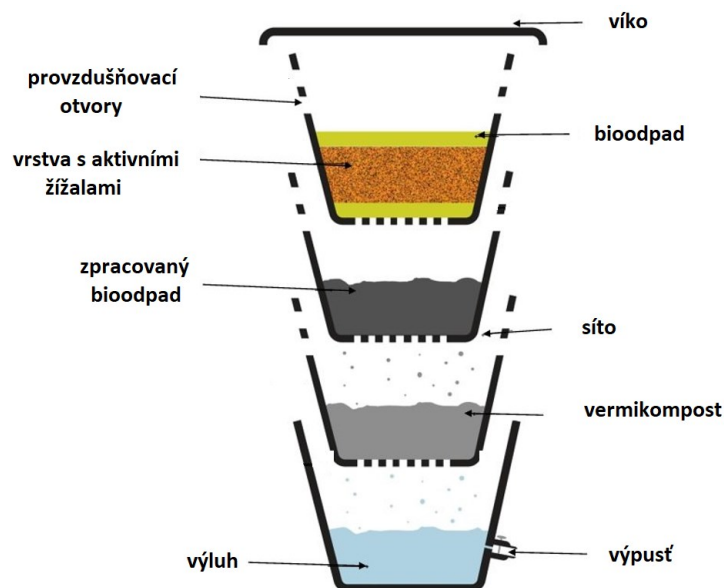
Přestože je kopřivová jícha známá především svou schopností zvyšovat odolnost proti biotickému stresu, pozorované vlastnosti naznačují také potenciál zlepšení obranyschopnosti proti stresu abiotickému. Komplexní mechanismus účinku, který byl často pozorován u biostimulantů efektivních ve zlepšení odezvy rostlin na stres navozený suchem či zasolením se podobá také některým účinkům kopřivové jíchy. Mezi ně lze zařadit například podporu půdního mikrobiomu, zlepšení zpřístupnění půdních živin nebo stimulaci metabolismu dusíku [13]. S ohledem na proteolytickou aktivitu doprovázející způsob její přípravy, by kopřivová jícha také mohla na rostliny působit částečně podobným účinkem, jako biostimulanty na bázi hydrolyzátů proteinů [61]. Kromě toho by se daly předpokládat také antioxidační účinky kopřivové jíchy spojené s bohatým zastoupením vitamínů A a C a polyfenolických látek v listech kopřiv [50].

1.3 Výluh z vermikompostu

Výluh z vermikompostu je vedlejším kapalným produktem vermikompostace, během níž je uvolňován procesem dekompozice organického materiálu mikroorganismy a žížalami. Odtok této tekutiny, lidově také nazývané žížalí čaj, může být podporován drenážním systémem [62].

1.3.1 Vermikompostace

Vermikompostace je podobně jako kompostování biooxidativní proces zpracování bioodpadu, který se však od kompostování liší zejména účelnou přítomností žížal. Epigeické žížaly, jako například *Eisenia fetida*, mají při vermikompostaci hned několik významných funkcí. Jedná se především o konzumaci organické hmoty, která tvoří až 90 % jejich potravy. Organická hmota je v důsledku průchodu trávicím traktem žížal rozmělnována na menší částice a dále je bakteriální činností rozkládána na jednodušší látky. Mezi enzymy vylučovanými bakteriemi jejich trávicího ústrojí byly identifikovány například proteasy, chitinasy, celulasy či fosfatasy. K procesu vermikompostace přispívá také pohyb žížal za potravou, který organickou hmotu nejen provzdušňuje, ale také zvyšuje její povrch pro další mikroorganismy podílející se na biochemických přeměnách s vermikompostací spojených [63–65]. Schéma nízkokapacitního vermikompostéru ilustruje následující Obr. 4 [66].



Obr. 4 Schéma nízkokapacitního vermikompostéru. Vermikompostování může probíhat jak velkoobjemově, tak i v malých domácích vermikompostech o objemu menších, než je 1 m³, což je minimální doporučený objem pro tradiční kompostování. Převzato a upraveno z [66].

Kromě toho vylučují přítomné žížaly také mukózní tekutinu (tzv. coelomic fluid), která jim napomáhá v pohybu a ochraně proti patogenům. V jejím složení byly kromě polysacharidů či lektinů odhaleny také proteasy a chitinasy. Proto má tato tekutina, která se zdá být i vhodným zdrojem živin pro mikroorganismy, řadu vlastností, jako jsou antifungální, antibakteriální, proteolytická a hemolytická aktivita. Tyto vlastnosti nejspíš přispívají i k nízkému obsahu patogenních organismů a jiných škůdců ve vermikompostu [67,68]. Ačkoliv je velký podíl patogenů vermikompostací eliminován, jejich přítomnost není zcela vyloučena. Kromě výše popsaných účinků tekutiny vylučované žížalami, k eliminaci patogenů přispívá také snížené množství kyslíku, spojené s průchodem trávicím traktem žížal a další proteolytické enzymy přítomné ve vermikompostu. Na rozdíl od běžného kompostování, chybí při vermikompostaci termofilní hygienizační fáze, při níž dochází k nárůstu teplot nad 55 °C. Množství a druh přítomných patogenů, souvisí také s původem zpracovaného materiálu. Možná je, ale i také vermikompostace již hotového hygienizovaného kompostu [65,69].

I přes nepřítomnost hygienizační fáze jsou však účinky vermikompostu popisovány jako pozitivní pro stav půdy i rostlin. V porovnání s kompostovanou organickou hmotou obsahuje vermikompost také významně vyšší množství prospěšných bakterií, hub a aktinomycet. Z prospěšných bakterií byla prokázána například přítomnost bakterií schopných fixovat atmosférický dusík, přispívajících solubilizaci živin v půdě nebo podporujících růst rostlin. Významný podíl mezi prospěšnými mikroorganismy mají se vši pravděpodobností také mykorrhizní druhy hub. Přítomny jsou také mikroorganismy, které mohou napomáhat obranným reakcím před rostlinnými nemocemi a škůdci. Příkladem mohou být aktinomycety či streptomycety, schopné produkovat enzym chitinasu, účinnou v obraně rostlin před patogenními houbami. Za ochranné a stimulační účinky vermikompostu na rostliny, však zřejmě nezodpovídají pouze rozmanitost a počet mikrobiálních druhů nebo celkově zlepšená dostupnost makronutrientů, ale také přítomnost fytohormonů, polyfenolických látek a huminových kyselin [65,70].

Za účelem získání výživného substrátu schopného zlepšovat úrodnost půdy a zdraví a růst rostlin, jsou k vermikompostaci využívány především odpady rostlinného původu a hospodářské hnoje. Ty typicky vykazují stimulační efekt růstu rostlin, pravděpodobně navozený kombinovaným efektem přítomných mikroorganismů, fytohormonů a huminových kyselin, kdy se jejich množství liší právě podle vermikompostovaného materiálu. Například větší množství fytohormonů bylo objeveno ve vermikompostu získaném zpracováním zahradního odpadu. Odlišnosti mohou být pozorovány také v obsahu rostlinných

makronutrientů i mikronutrientů. Přehled rozdílného obsahu živin dle vstupního materiálu vermikompostace dobře shrnuje studie Elissen et al. z roku 2023 [71]. Například obsah základních živin z živočišných zdrojů se v porovnání s rostlinnými nemusí vždy výrazně lišit, jak popisuje následující Tab. 1.

Tab. 1 Obsah makronutrientů ve vybraných vermikompostech. *Poměr neuveden. Převzato z [71].

Vermikompostovaný odpad	Obsah dusíku (g/kg sušiny)	Obsah fosforu (g/kg sušiny)	Obsah draslíku (g/kg sušiny)
Zahradní odpad	23	10	6
Kravský hnůj	17	15	18
Směs zahradního odpadu a kravského hnoje*	17–32	4–10	7–17

Jak již bylo zmíněno, vermikompostovány mohou být čistě rostlinné nebo živočišné odpady, stejně tak ale i jejich směsi nebo například odpady pocházející z papírenského nebo gastronomického průmyslu nebo odpady z kanalizací nebo čistíren odpadních vod. V případě výrazně znečištěných odpadů však nelze zaručit veškeré prospěšné účinky pro rostliny či půdu. Vermikompostací těchto odpadů lze ale znečištění výrazně snížit, tak že se výsledný vermikompost stane organickou hmotou často schopnou navrácení do půdy. Pozorován byl také remediační potenciál vermikompostu s ohledem na těžké kovy nebo některé organické polutanty (organopesticidy). Popsána byla například vazba těžkých kovů metalothioneiny v těle žížal nebo redoxní aktivita měnící jejich oxidační stav. Sorpce organických polutantů byla na druhou stranu podpořena přítomností huminových kyselin [63,64].

1.3.2 Zlepšení odpovědi na abiotický stres

Stejně jako finální produkt vermikompostace je i výluh z vermikompostu používán pro svůj vliv na růst a obranyschopnost rostlin. Při ošetření výluhem z vermikompostu bylo pozorováno pozitivní ovlivnění obranyschopnosti rostlin vůči abiotickým stresům a zejména pak vystavení stresu zasolením a suchem. V případě stresu suchem bylo zaznamenáno zvýšení příjmu vody rostlinami. Tento efekt, přímo spojovaný s přítomností mykorrhizních hub, vede ke zlepšení celkového zdraví rostlin. Zlepšení jejich vitality je také přisuzováno kombinaci přítomných živin a fotochemikálií, stejně tak jako bohatšímu zastoupení prospěšných mikroorganismů. Dalším pozorovaným účinkem produktů vermikompostace na rostliny vystavené abiotickým stresům je také stimulace antioxidačního systému. Zaznamenáno bylo zvýšení aktivity antioxidačních enzymů a fenolických látek v rostlinách. Kromě vlastní syntézy fenolických

látek navozené právě aktivací antioxidačního systému byl pozorován také příjem některých fenolických látek z produktů vermikompostu kořeny. Pozorován byl ale také pokles vybraných fenolických látek [71,72]. Studie autorů Voko et. al z roku 2022 popisuje pokles flavonoidů, jako součást komplexní odpovědi na stres suchem. Ta byla zlepšena opakovanou aplikací výluhu vermikompostu pocházejícího ze zahradního bioodpadu na rostliny vystavené suchu. Dle této studie měly rostliny fazolí *Vigna unguiculata* ošetřené výluhem z vermikompostu opakovaně po dobu 13 týdnů po vystavení suchu více listů a pupenů než rostliny kontrolní. Zvýšený byl také obsah chlorofylu a a b v listech [73]. Ke zvýšení obsahu chlorofylu v listech došlo i v případě vlivu zasolení na rostliny granátovníku, jak popisují Bidabadi et al. v práci z roku 2017 [74]. Chlorofyl je v průběhu abiotických stresů často degradován vlivem oxidativního stresu způsobeného nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku v chloroplastech. Zvýšení obsahu chlorofylu by tak mohlo souviset s přítomností cytokininů. Zvýšení počtu listů by mohlo souviset s přítomností dalších fytohormonů a huminových kyselin [60,72]. Poznatky o fytohormonech a huminových kyselinách v souvislosti s výluhem z vermikompostu jsou popsány v další kapitole.

1.3.3 Fytohormony a huminové kyseliny v produktech vermikompostace

Přestože výluh z vermikompostu obsahuje velké množství živin, k použití pro rostliny je často dávkován ve zředěné formě, která již tolik živin neobsahuje. I přes to ale vykazuje biostimulační účinky. Tyto efekty jsou přisuzovány kombinovanému účinku přítomnosti mikroorganismů, fytohormonů, polyfenolických látek a huminových kyselin [71,75].

Přítomnost fytohormonů v produktech vermikompostování byla potvrzena již několika studiemi. V práci autorů Aremu et al. z roku 2015 bylo ve výluhu pocházejícího z vermikompostace zahradního odpadu identifikováno hned několik rostlinných hormonů. Byla zjištěna přítomnost auxinu v jeho nejběžnější formě – kyselině indol-3-octové, dále osmnáct různých forem gibberelinů, z nichž 10 % z jejich celkového poolu tvořily bioaktivní formy, čtyři formy cytokininů a šest typů brassinosteroidů. Zjištěné množství fytohormonů se pohybovalo řádově v pg/ml výluhu s výjimkou brassinosteroidů, u nichž bylo zjištěné množství nižší (fg/ml). Zjištěné formy příslušných fytohormonů i jejich koncentrace by byly schopné u rostlin vyvolat příslušné účinky. Tomu také odpovídaly některé efekty pozorované v rámci řady různých samostatně vedených studií, které se vlivem výluhu z vermikompostu na rostliny zabývaly. Pozorována byla například stimulace cytoplasmatické H⁺ ATPasy, zjištěná také při exogenní stimulaci auxinem. Zlepšení tolerance abiotického stresu u rostlin vystavených zasolení a nedostatku živin po aplikaci výluhu z vermikompostu by zase mohla nasvědčovat

účinkům přítomných giberelinů i brassinosteroidů. Tato tolerance byla spojena se zvýšením množství prolinu, spojeného se signalizací v reakci na oxidativní stres a eliminací reaktivních forem. Stejně tak byly u testovaných rostlin ošetřených výluhem z vermikompostu pozorovány účinky cytokininů, vyznačující se mimo jiné podporou laterálního růstu kořenů nebo produkce chlorofylu a stimulace tvorby chloroplastů [60].

Studie autorů Hernandez et al. z roku 2015, zabývající se huminovými kyselinami izolovanými z výluhu z vermikompostu, popisuje po ošetření zvýšení počtu listů u rostlin salátu. Příslušnými zjištěnými změnami byl pokles celkových sacharidů, nárůst celkových proteinů, indukce nitrátreduktasy a fenylalaninamoniumlyasy v listech rostlin [76]. Dalším známým účinkem huminových kyselin je také účast na regulaci signalizace, a to jak hormonální, tak i založené na reaktivních formách kyslíku. Zjištěn byl například vliv stimulace cytoplasmatické H⁺ ATPasy, který nasvědčuje určité schopnosti huminových kyselin mimikovat auxin. Kromě toho by se huminové kyseliny, mohly podílet nejen na sorpci živin a iontů kovů, ale i některých organických polutantů a zmírňovat tak, jejich nepříznivý vliv na rostliny [70,76].

1.3.4 Zlepšení odpovědi rostlin na biotický stres po aplikaci vermikompostu

Také účinky výluhu z vermikompostu proti biotickému stresu byly podrobeny řadě studií. Bylo zjištěno, že na potlačení onemocnění rostlin vlivem ošetření produkty vermikompostace se podílí řada mechanismů, které zahrnují kompetici bakterií o živiny, antibiόzu, hyperparazitismus nebo indukovanou systémovou rezistenci. Dosud byly pozorovány účinky produktů vermikompostace například v redukcii počtů hlístic a řady druhů fytopatogenních bakterií a hub. Stejně jako v případě zlepšení odezvy na abiotický stres hraje významnou roli obsah fytohormonů, huminových kyselin a polyfenolických látek. Přítomnost některých fenolických látek například napomáhala inhibici množení hlístic. Pozorovaná byla také antimikrobiální aktivita spojená s tekutinou vylučovanou žížalami. Dále byly v produktech vermikompostace popsány obranné reakce spojené s přítomností některých bakteriálních druhů. Například bakterie druhu *Bacillus subtilis* M29 napomohla s inhibicí růstu onemocnění způsobeného plísni druhu *Botrytis cinerea* vylučováním velkého množství VOC. Pozorován byl také například pozitivní vliv na stimulaci Ca²⁺ dependentní signalizační dráhy navozený myhorrhizním druhem houby *Mortierella hyalina*, který vedl k rozvoji rezistence vůči patogenní houbě *Alternaria brassicae*. Ačkoliv konkrétní druhy mikroorganismů se dle původu vermikompostovaného bioodpadu liší a o jejich zastoupení mnoho studií nepojednává, bylo by možné tohoto faktu využít cílenou vermikompostací některých bioodpadů a podpořit tak

přítomnost konkrétních prospěšných mikroorganismů. Například vermikompostací bobovitých rostlin by došlo ke zvýšení množství rhizobakteriálních druhů, které se ukázaly jako účinné při inhibici růstu některých plísní. Výhodu by bylo také zvýšené množství dusíku ve vermikompostu oproti jiným zpracovávaným materiálům, jak bylo pozorováno při vermikompostaci rostlinných zbytků janovce metlatého (*Cytisus scoparius*) [71,72].

1.3.5 Fytotoxicita výluhu z vermikompostu

Výluh z vermikompostu je často aplikován v ředěné formě, a to buď ve formě závlivky, nebo také postřiku. Dalším způsobem aplikace je také přidání do živného roztoku v případě hydroponického pěstování [62,75]. Kromě pěstování rostlin bylo živné médium obohacené o výluh z vermikompostu již použito také k primingu semen, u nichž byl následně pozorován nárůst odolnosti růstu při teplotách nad 40 °C [77]. Ačkoliv obecně uváděný doporučený poměr výluhu z vermikompostu ku vodě je 1 : 9, některé práce uvádějí i odlišně zvolená ředění. Například Kateřina Klubalová ve své diplomové práci uvádí vhodné ředění pro hydroponické pěstování 1 : 40 [78]. Vedle toho Gutiérrez-Miceli et al. v práci z roku 2008 uvádějí, že jimi použitý výluh z vermikompostu nebyl ředěn vůbec a pro posílení účinků byl navíc kombinován s NPK hnojivou [62]. Význam diskuze ředění výluhu z vermikompostu leží v problému fytotoxicity příliš koncentrovaných dávek. Ta je patrná především při klíčení semen. Fytotoxicita je často vysvětlována kombinovaným efektem pravděpodobně vyvolaným zasolením, vysokou koncentrací polyfenolických látek nebo nežádoucími fyzikálními změnami v půdě. Univerzální ředění výluhů z vermikompostu, předcházející fytotoxických účinků, tedy nelze s jistotou určit a může se stejně jako pozorované pozitivní účinky lišit nejen dle původu vermikompostovaného materiálu, ale také v závislosti na četnosti, množství a způsobu dávkování nebo fázi růstu a druhu ošetřované rostliny [64,65].

2 Cíle práce

1. Charakterizace přírodních biostimulantů na bázi kopřivové jíchy a výluhu z vermikompostu
2. Posouzení vlivu biostimulantů na růst rostlin kukuřice a antioxidační systém
3. Analýza vlivu sucha na rostliny kukuřice ošetřené biostimulanty

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)	(Sigma-Aldrich, USA)
2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH)	(Sigma-Aldrich, USA)
2,4,6-Tris(2-pyridyl- <i>s</i> -triazin) (TPTZ)	(Sigma-Aldrich, USA)
2-amino-2-methyl-1-propanol hydrochlorid (AMP)	(Merck KGaA, Německo)
3,3'-diaminobenzidin (DAB)	(Sigma-Aldrich, USA)
3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazon hydrochlorid hydrát (MBTH)	(Sigma-Aldrich, USA)
3-morfolinopropan-1-sulfonová kyselina (MOPS)	(Sigma-Aldrich, USA)
Akrylamid	(Sigma-Aldrich, USA)
Azokasein	(Sigma-Aldrich, USA)
Bisakrylamid	(Sigma-Aldrich, USA)
Bradfordovo činidlo	(Bio-Rad, Německo)
Bromfenolová modř	(Sigma-Aldrich, USA)
Coomassie Brilliant Blue G-250	(Sigma-Aldrich, USA)
Dihydrogenfosforečnan draselný	(Lachema-Chemapol, ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný	(Lachema-Chemapol, ČR)
Dithiotreitol	(Sigma-Aldrich, USA)
Dodecylsíran sodný (SDS)	(Sigma-Aldrich, USA)
Dusičnan stříbrný	(Sigma-Aldrich, USA)
Dusík, kapalný	(Linde Gas, ČR)
Ethanol 96% (w/v)	(Lach-Ner, ČR)
Ethylendiamintetraoctan sodný dihydrát (EDTA)	(Sigma-Aldrich, USA)
Fenazin methosulfát (PMS)	(Sigma-Aldrich, USA)
Fenol	(Sigma-Aldrich, USA)
Folin-Ciocalteuovo fenolové reagens	(VWR Chemicals, USA)
Formaldehyd 36–38% (w/v)	(Lach-ner ČR)
Glukosa	(Sigma-Aldrich, USA)
Glutathion, oxidovaná forma	(Sigma-Aldrich, USA)
Glycerol	(Lach-Ner, ČR)
Glycin	(VWR, USA)

Hovězí sérový albumin (BSA)	(Sigma-Aldrich, USA)
Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát	(Penta, ČR)
Hydroxid sodný	(VWR, USA)
Chitin	(Sigma-Aldrich, USA)
Chlorid hořečnatý	(Sigma-Aldrich, USA)
Chlorid železitý hexahydrát	(Sigma-Aldrich, USA)
Kasein	(Reanal, Maďarsko)
Kyselina askorbová	(Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina citronová bezvodá	(Lachema, ČR)
Kyselina chlorovodíková 35% (w/v)	(Penta, ČR)
Kyselina octová 99 % (w/v)	(Lachema, ČR)
Kyselina sulfanilová	(Sigma-Aldrich, USA)
Laminarin	(Sigma-Aldrich, USA)
L-tyrosin	(Merc, Německo)
Methyl-celulosa	(Sigma-Aldrich, USA)
N,N,N',N'-tetramyletylendiamin (TEMED)	(Thermo Scientific, USA)
Nikotinamidadenindinukleotid fosfát redukovaný	(PanReac AppliChem, USA)
Nitroblue tetrazolium chlorid (NTB)	(Sigma-Aldrich, USA)
Octan sodný trihydrát	(Lachema-Chemapol, ČR)
Peroxid vodíku 30% (w/v)	(VWR Chemicals, USA)
Peroxodisíran amonný	(Sigma-Aldrich, USA)
Pierce Fluorescent Protease Assay Kit	(Thermo Scientific, USA)
p-nitrofenol	(Sigma-Aldrich, USA)
p-nitrofenylfosfát sodný hexahydrát (PNPP)	(PanReac AppliChem, USA)
Polyvinylpolypyrrolidon (PVP)	(Sigma-Aldrich, USA)
Proteinový standard 6,5–26,6 kDa	(Serva, Německo)
Proteinový standard 10–250 kDa	(Thermo Scientific; USA)
Sacharosa	(Penta, ČR)
Síran amonno-železitý dodekahydrát	(Penta, ČR)
Síran měďnatý pentahydrát	(Penta, ČR)
Thiosíran sodný	(Lachema, ČR)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	(Roche Diagnostics, Německo)

Trolox	(Sigma-Aldrich, USA)
Uhličitan sodný	(Lachema, ČR)
Vinan sodno-draselný	(Lachema, ČR)
β -merkaptoethanol	(Sigma-Aldrich, USA)

3.2 Laboratorní vybavení

Analytické váhy XE-100 A	(Denver Instrument Company, USA)
Centrifuga Universal 32 R	(Hettich Zentrifugen, Německo)
Čtečka mikrotitračních destiček Infinite M200 Pro	(Tecan, Švýcarsko)
Čtečka mikrotitračních destiček Multiscan Go	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Digitální programovatelný rozvaděč MDZ3	(Malapa, ČR)
Elektroforetická sada Biometra	(Biometra, Německo)
Elektroforetická sada Mini-PROTEAN	(Bio-Rad, USA)
Iluminační deska na gely Slimlite plano	(Kaiser Fototechnik, Německo)
Laboratorní váhy Kern 440-45	(Kern, SRN)
LED Osvětlení Zeus 600 W Pro	(Lumatek, Malta)
Lyofilizátor Lyovac GT 2 E	(Finn-Aqua, Finsko)
Magnetická míchačka RH basic	(IKA, Německo)
Mini inkubátor	(Labnet, USA)
Pěstební stan Pro 150	(Mammoth, Nizozemsko)
pH metr UltraBASIC UB-10	(Denver Instruments Company, USA)
Sonikátor Sonixa Ultrasonic Cleaner	(Soltec, Itálie)
Spektrofotometr Helios α Spectronic	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Spektrofotometr SPECORD 250 Plus	(Analytik Jena, Německo)
Stolní centrifuga miniSpin	(Eppendorf, Německo)
Termoblok Elite	(Major Science, Taiwan)
TermoMixer C	(Eppendorf, Německo)
Třepačka Multitron Standard	(Infors HT, Švýcarsko)
Třepačka Thermal Shake lite	(VWR, USA)
Vortex V-1 plus	(Biosan, Litva)
Zdroj napětí Power Pack P25 T	(Biometra, Německo)

3.3 Pěstování rostlin

3.3.1 Zdroj biostimulantů

Použity byly dva biostimulanty přírodního původu – kopřivová jícha a výluh z vermikompostu. Kopřivová jícha byla připravena fermentací nadzemních částí rostlin kopřiv ve vodě v poměru 1 : 5 (w/v) po dobu 4 týdnů. Výluh z vermikompostu byl obdržen ve spolupráci s RNDr. Petrou Inemannovou, Ph.D. z Ústavu pro životní prostředí PřF UK. Byl získán jako druhotný kapalný produkt vermikompostace rostlinné biomasy – posekaná tráva (80 %), odpad z jablek (10 %), kávová sedlina (10 %). Oba biostimulanty byly filtrovány přes gázu a lyofilizovány.

3.3.2 Experimentální provedení

Rostliny kukuřice byly pěstovány ve stanech Mamooth Pro 150 s vlastní regulací vnitřního prostředí a oddělenými segmenty dne a noci (MDZ 3; Malapa). Teplota se pohybovala v rozmezí 23–27 °C. Osvětlení (Zeus 600W; Lumatek) nastavené na 50 % bylo rostlinám k dispozici po dobu osm hodin denně. Interval noci byl nastaven na šestnáct hodin. K pěstování byly využity plastové květináče (15 × 11,5 cm) s objemem 1,5 l.

Semena kukuřice *Zea mays L.* kultivaru DKC 3969 (Monsanto, ČR) byla vždy vysazována asi 1 cm pod povrch substrátu. Následně byl substrát důkladně navlhčen a květináče byly umístěny do plastových táčů s poklopem pro udržení vlhkosti. Po vyklíčení asi po jednom týdnu pěstování byly rostliny opakovaně ošetřeny zálivkou biostimulantů (kopřivové jíchy nebo výluhu z vermikompostu) podle Tab. 2–4. Biostimulanty byly aplikovány v podobě roztoků lyofilizátů. Kontrolní rostliny nebyly biostimulanty ošetřeny. V rámci optimalizace stanovení efektů biostimulantů byly rostliny odděleně pěstovány ve třech různých experimentech. Fázi růstu rostlin kukuřice před přidáním první zálivky biostimulantů ilustruje Obr. 5 na následující straně.



Obr. 5 Rostliny kukuřice krátce po vyklíčení, před aplikací první zálivky biostimulantů.

3.3.2.1 Experiment 1

Rostliny byly po vyklíčení ošetřeny zálivkou 20 ml biostimulantu o koncentracích 0,5; 1; 1,5 a 3 g/l. Zálivka byla aplikována dvakrát týdně po dobu dvou týdnů. Tento experiment obsahoval devět skupin rostlin popsanych v následující Tab. 2. Každá skupina sestávala ze tří rostlin. Rostliny byly sklizeny 24. den od vysazení. Pro pěstování byl použit zahradnický substrát značky Agro.

Tab. 2 Přehled pěstovaných skupin rostlin kukuřice v rámci experimentu 1.

Experiment 1– zahradnický substrát (Agro)	
Označení	Způsob ošetření rostlin
K	bez ošetření
V0,5	výluh z vermikompostu 0,5 g lyofilizátu/l
V1	výluh z vermikompostu 1 g lyofilizátu/l
V1,5	výluh z vermikompostu 1,5 g lyofilizátu/l
V3	výluh z vermikompostu 3 g lyofilizátu/l
J0,5	kopřivová jícha 0,5 g lyofilizátu/l
J1	kopřivová jícha 1 g lyofilizátu/l
J1,5	kopřivová jícha 1,5 g lyofilizátu/l
J3	kopřivová jícha 3 g lyofilizátu/l

3.3.2.2 Experiment 2

Dle výsledků z prvního experimentu byly rostliny v druhém experimentu ošetřeny vždy zálivkou 20 ml biostimulantu o koncentraci 20 g/l. Zálivka byla aplikována dvakrát po dobu

jednoho týdne. Poté byly rostliny rozděleny na zalévané rostliny a rostliny vystavené suchu po dobu osmi dnů. Tento experiment obsahoval šest skupin rostlin popsanych v následující Tab. 3. Každá skupina sestávala ze sedmi rostlin. Rostliny byly sklizeny 21. den od vysazení. Pro pěstování byl použit zahradnický substrát značky Agro.

Tab. 3 Přehled pěstovaných skupin rostlin kukuřice v rámci experimentu 2.

Experiment 2 – zahradnický substrát (Agro)	
Označení	Způsob ošetření rostlin
K	bez ošetření
KS	bez ošetření + 8 dní sucha
V	výluh z vermikompostu 20 g lyofilizátu/l
VS	výluh z vermikompostu 20 g lyofilizátu/l + 8 dní sucha
J	kopřivová jácha 20 g lyofilizátu/l
JS	kopřivová jácha 20 g lyofilizátu/l + 8 dní sucha

3.3.2.3 Experiment 3

Ve třetím experimentu byl pokus se suchem opakován se substrátem s nižším obsahem přidaných živin Original Light Mix značky Biobizz. Zálivka o objemu 20 ml biostimulantů o koncentraci 20 g/l byla aplikována dvakrát během jednoho týdne. Rostliny v tomto experimentu byly také rozděleny na zalévané rostliny a rostliny vystavené suchu, které nebyly po dobu čtyř dnů zalévány. Tento experiment obsahoval šest skupin rostlin popsanych v následující Tab. 4. Každá skupina sestávala ze čtyř rostlin. Rostliny byly sklizeny 21. den od vysazení.

Tab. 4 Přehled pěstovaných skupin rostlin kukuřice v rámci experimentu 3.

Experiment 3 – substrát Original Light Mix (Biobizz)	
Označení	Způsob ošetření rostlin
K	bez ošetření
KS	bez ošetření + 4 dny sucha
V	výluh z vermikompostu 20 g lyofilizátu/l
VS	výluh z vermikompostu 20 g lyofilizátu/l + 4 dny sucha
J	kopřivová jácha 20 g lyofilizátu/l
JS	kopřivová jácha 20 g lyofilizátu/l + 4 dny sucha

3.3.3 Sklizeň rostlin

Byly odebrány zvlášť vzorky listů, kořenů, stonků a půdy. Z těchto rostlinných částí byl vytvořen směsný vzorek rozdělený na menší podíly o hmotnosti 1–1,5 g listů; 3–4 g stonků a 0,2–0,3 g kořenů pro každou experimentální skupinu. Všechny vzorky byly ihned po odebrání zamrazeny v kapalném dusíku. Rovněž z půdy jednotlivých skupin byl vytvořen směsný vzorek, který byl dále lyofilizován a přeset na sítu s průměrem 500 µm. Všechny odebrané vzorky byly dále uchovávány při –80 °C.

3.4 Příprava materiálu pro analýzy

3.4.1 Příprava extraktů z listů a kořenů rostlin

Vzorky listů a kořenů byly pro veškerá stanovení homogenizována ve třecí misce s kapalným dusíkem. K homogenizátu přidáno příslušné extrakční činidlo dle použité metody (viz Metody) a extrakce probíhala při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Poměr čerstvé hmotnosti ku extrakčnímu činidlu byl v případě listů 1 : 2 až 1 : 4 a v případě kořenů 1 : 1 až 1 : 2. Při extrakci rostlinného materiálu určenému ke stanovení enzymových aktivit bylo k extrakčnímu činidlu přidáváno také přibližně 0,02 g/ml PVP. Extrakty byly získány po odstředění na centrifuze Hettich Zetrefugen 32R při 16 600× g po dobu 15 min a 4 °C

3.4.2 Příprava roztoků biostimulantů

Lyofilizované biostimulanty byly extrahovány převedením navážky lyofilizátu do mikrozkušavky a přidáním extrakčního činidla. Převedení do roztoku, kterému předcházelo důkladné promíchání na vortexu probíhalo po dobu 15 minut (třepačka Thermal Shake lite; 25 °C; 200 RPM). Supernatanty byly získány po odstředění na centrifuze při 16600× g po dobu 10 min. Maximální množství biostimulantů převeditelné do roztoků bylo 100 g/l v případě kopřivové jáchy a 60 g/l v případě výluhu z vermikompostu. Takto připravené roztoky byly dále ředěny dle kalibračního rozsahu dané metody. V případě stanovení proteas bylo porovnáno použití extraktu z biostimulantů s přidáním lyofilizátu biostimulantu přímo do reakční směsi. (viz Metody). Pro elektroforetickou separaci peptidů byly použity roztoky biostimulantů o koncentraci 20 a 50 g/l v případě kopřivové jáchy a 20 a 60 g/l v případě vermikompostu.

3.4.3 Příprava vzorků z půdy pro analýzy

V případě stanovení enzymových aktivit v půdě obsahovala reakční směs vždy 5 mg vzorku půdy. Pro stanovení endoglykosidas byl použit extrakt půdy připravený z 1 g půdy v 7 ml extrakčního činidla (viz Metody).

3.5 Metody

3.5.1 Stanovení obsahu proteinů dle Bradforda

Stanovení obsahu proteinů dle Bradforda je založeno na navázání barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na protein. Reakce probíhá v kyselém prostředí a vazba barviva posouvá jeho absorpční maximum z 465 na 595 nm [79].

Do jamek mikrotitrační destičky bylo v triplikátech pipetováno vždy 20 μ l vhodně zředěných extraktů listů a kořenů. Ty byly připraveny extrakcí v pufru o pH = 7,5 (100mM Tris-HCl; 5mM EDTA; 1mM DTT; 10mM kyselina askorbová) viz Příprava materiálu pro analýzy. Do každé jamky bylo přidáno 200 μ l Bradfordova činidla a vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut. Poté byl měřen poměr absorbancí při 595 a 450 nm. Kalibrace byla zhotovena ze standardních roztoků BSA v rozsahu 0,1–0,5 mg/ml. V blanku byl místo vzorku použit stejný objem pufru.

3.5.2 Stanovení množství proteinů dle Lowryho

Stanovení obsahu proteinů metodou dle Lowryho je založeno na reakci Cu^{2+} iontů s peptidovou vazbou v alkalickém prostředí. Tato reakce v kombinaci s oxidací postranních řetězců aminokyselin cysteinu, tyrosinu a tryptofanu poskytuje modré zbarvení [79].

Do jamek mikrotitrační destičky bylo v triplikátech pipetováno vždy 15 μ l vhodně zředěných roztoků biostimulantů. Ty byly připraveny rozpuštěním v pufru o pH = 7,5 (100mM Tris; 5mM EDTA; 1mM DTT; 10mM kyselina askorbová) viz Příprava materiálu pro analýzy. Do každé jamky bylo přidáno 165 μ l čerstvě smíchaného roztoku C (roztok 2% (w/v) Na_2CO_3 v 1M NaOH a roztok 0,5% (w/v) CuSO_4 v 1% (w/v) vinanu sodno-draselném v poměru 50:1) a vzorky byly inkubovány 10 minut. Dále bylo přidáno 20 μ l 50% (v/v) Folin-Ciocalteuova činidla a vzorky byly inkubovány 30 minut. Poté byla měřena absorbance při 700 nm. Kalibrace byla zhotovena ze standardních roztoků BSA v rozsahu 0,1–0,7 mg/ml. V blanku byl vzorku použit stejný objem pufru.

3.5.3 Stanovení obsahu fenolických látek

Obsah fenolických látek byl stanoven Folin-Ciocalteuovou metodou. Komplexy kyseliny molybdenové a wolframové přítomné ve Folin-Ciocalteuově činidle přijímají v zásaditém prostředí elektrony od fenolických látek přítomných v extraktu. Tyto reakce vedou ke vzniku modrého zbarvení [80].

V rámci této metody byl stanovován obsah fenolických látek v roztocích biostimulantů a v extraktech listů a kořenů studovaných rostlin. Do jamek mikrotitrační destičky bylo v triplicátech pipetováno vždy 20 µl vhodně zředěných vzorků. Ty byly připraveny rozpuštěním nebo extrakcí v 50% (v/v) ethanolu viz Příprava materiálu pro analýzy. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl komerčního 10% (v/v) Folin-Ciocalteuova činidla. Vzorky byly inkubovány po dobu 4 minut. Dále bylo do každé jamky přidáno 80 µl Na₂CO₃ o koncentraci 75 g/l a vzorky byly inkubovány dalších 28 minut. Poté byla měřena absorbance při 760 nm. Kalibrace byla zhotovena ze standardních roztoků fenolu v rozsahu 50–850 µM. V blanku byl místo vzorku použit stejný objem demineralizované vody.

3.5.4 Stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP

Stanovení antioxidační kapacity pomocí metody FRAP (z aj. ferric ion reducing antioxidant power) je založeno na schopnosti antioxidantů přítomných v rostlinném extraktu redukovat železitý komplex [Fe(TPTZ)₃]³⁺ na komplex železnatý [Fe(TPTZ)₂]²⁺ za vzniku modrého zbarvení. Tato reakce probíhá v kyselém prostředí [80].

V rámci této metody byla stanovována antioxidační kapacita v roztocích z biostimulantů a extraktech listů a kořenů studovaných rostlin. Do jamek mikrotitrační destičky bylo v triplicátech pipetováno vždy 40 µl vhodně zředěných vzorků. Ty byly připraveny rozpuštěním nebo extrakcí v 50% (v/v) ethanolu viz Příprava materiálu pro analýzy. Do každé jamky bylo přidáno 200 µl před světlem chráněného FRAP činidla. To bylo připravováno vždy čerstvé smícháním roztoků TPTZ, FeCl₃ a acetátového pufru v poměru 5 : 2 : 13. Složení těchto roztoků bylo následující: 700µM TPTZ rozpuštěný v 40mM HCl, 20mM vodný roztok FeCl₃ a 300mM roztok acetátového pufru o pH = 3,6. Vzorky byly inkubovány po dobu 10 minut. Poté byla měřena absorbance při 593 nm. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních roztoků kyseliny askorbové v rozsahu 10–100 µmol/l. V blanku byl místo vzorku použit stejný objem demineralizované vody.

3.5.5 Stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH

Stanovení antioxidačních vlastností pomocí metody DPPH je založeno na schopnosti antioxidantů přítomných v extraktu biostimulantů zhaset tento volný radikál. Relativně stabilní radikál DPPH přijímá atomy vodíku poskytnuté antioxidantem. Tuto reakci provází barevná změna reakční směsi z fialové na žlutou [80].

Do jamek mikrotitrační destičky bylo v triplicátech pipetováno vždy 50 μ l vhodně zředěných roztoků biostimulantů. Ty byly připraveny rozpuštěním v 50% (v/v) ethanolu viz Příprava materiálu pro analýzy. Do každé jamky bylo přidáno 100 μ l 96% (w/v) ethanolu a 50 μ l před světlem chráněného roztoku DPPH. Roztok DPPH o koncentraci 400 μ M v 96% (w/v) ethanolu, byl připravován vždy čerstvý a používán byl pouze dalších 30 minut po přípravě. Vzorky byly inkubovány po dobu 12 minut. Poté byla měřena absorbance při 517 nm. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních roztoků troloxu v rozsahu 40–160 μ mol/l. V blanku byl místo vzorku použit stejný objem demineralizované vody, vynechán byl ale i přídavek roztoku DPPH, který byl nahrazen 96% (w/v) ethanolom. Měření zahrnovalo také referenci, kde byl vzorek nahrazen demineralizovanou vodou.

3.5.6 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Obsah celkových sacharidů byl stanoven metodou dle Duboise. Principem této metody je dehydratace sacharidů kyselinou sírovou. Vzniklý fural (v případě pentos) nebo 5-hydroxymethylfural (v případě hexos) kondenzuje s fenolem za vzniku červeného zbarvení [81].

Do skleněných zkumavek byl v triplicátech pipetován 1 ml vhodně zředěného extraktů z listů. Ty byly připraveny extrakcí v pufru o pH = 7,5 (100mM Tris-HCl; 5mM EDTA; 1mM DTT; 10mM kyselina askorbová) viz Příprava materiálu pro analýzy. Dále byl přidán 1 ml 5% (w/v) fenolu a 5 ml 98% (w/v) H₂SO₄. Po promíchání byl roztok inkubován po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byla ve skleněné kyvetě o optické délce 1 cm měřena absorbance při 490 nm. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních roztoků glukosy v rozsahu 0,2–1 mM. Blank byl připraven nahrazením vzorku demineralizovanou vodou.

3.5.7 Stanovení aktivity glutathionreduktasy

Aktivita glutathionreduktasy byla stanovena na základě kinetického měření, při kterém byl sledován úbytek množství NADPH v reakční směsi [82].

Extrakt listů a kořenů byly připraveny extrakcí v pufru o pH = 7,5 (100mM Tris-HCl; 5mM EDTA; 1mM DTT; 10mM kyselina askorbová) viz Příprava materiálu pro analýzy. Reakční směs byla v triplicátech pipetovaná do plastových kyvet o optické dráze 1 cm a o celkovém objemu 1 ml. Směs obsahovala: 0,2mM NADPH; 1,3mM oxidovanou formu glutathionu; 0,1mM EDTA; 125mM Tris-HCl pufr o pH = 8. Reakce byla vždy zahájena přidáním 40 μ l enzymového extraktu. Po zahájení reakce byl sledován pokles absorbance při 340 nm po dobu 10 minut při 30 °C.

3.5.8 Stanovení aktivity proteas

3.5.8.1 Stanovení aktivity proteas pomocí azokaseinu

Stanovení proteolytické aktivity pomocí azokaseinu je založeno na uvolnění červeno-oranžové chromoforové skupiny po hydrolyze tohoto substrátu [83].

V rámci této metody byla stanovována aktivita proteas v roztocích biostimulantů v porovnání s jejich navázkou 4 mg v případě kopřivové jichy a 6 mg v případě výluhu z vermikompostu. Ty byly připraveny extrakcí v McIlvainově pufru o pH = 6,5 (0,1M kyselina citronová; 0,2M Na₂HPO₄) v souladu s pH optimem viz Příprava materiálu pro analýzy. V případě navážky bylo přímo do mikrozkušavek navažováno 4 mg kopřivové jichy a 6 mg výluhu z vermikompostu.

Do mikrozkušavek obsahujících buď navážku jednotlivých biostimulantů nebo 10 µl roztoku bylo v triplicátech pipetováno 25 µl McIlvainova pufru o pH = 6,5 a 15 µl vody. Reakce byla zahájena přidáním 50 µl 1,25% (w/v) azokaseinu. Následovala inkubace (třepačka Thermal Shake lite; 37 °C; 300 RPM) po dobu 60 minut v případě jichy a 24 hodin v případě výluhu z vermikompostu. Reakce byla po uplynutí inkubační doby zastavena přidáním 17 µl 25% (v/v) kyseliny trichloroctové a vzniklá sraženina byla odstředěna na stolní centrifuze MiniSpin při 12100× g po dobu 5 minut. Následně bylo do jamky mikrotitrační destičky přeneseno 100 µl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 100 µl 2M NaOH. Byla měřena absorbance při 450 nm. Kalibrace metody byla zhotovena z dvojkové geometrické ředící řady roztoku 1,25% (w/v) azokaseinu. Blank byl připraven přidáním vzorků do reakční směsi již obsahující 17 µl 25% (v/v) kyseliny trichloroctové.

3.5.8.2 Stanovení aktivity proteas pomocí kaseinu

Stanovení proteolytické aktivity spočívá v kvantifikaci uvolněných peptidů s Folin-Ciocalteuovým činidlem po hydrolyze kaseinu. Neštěpený protein je odstraněn precipitací a následnou centrifugací. Výsledkem této reakce, probíhající v zásaditém prostředí, je vznik modrého zbarvení [84].

V rámci této metody byla stanovována aktivita proteas v extraktech kořenů. Pro měření aktivity proteas touto metodou byly enzymové extrakty připraveny extrakcí v McIlvainově pufru o pH = 9 (0,2M Na₂HPO₄) v souladu s pH optimem viz Příprava materiálu pro analýzy. Do mikrozkušavek bylo v triplicátech pipetováno 20 µl McIlvainova pufru o pH = 9 (0,2M Na₂HPO₄) a 20 µl 0,65% (w/v) kaseinu (připraveného rozpouštěním kaseinu v 1% (w/v) roztoku Na₂CO₃ po dobu 10 minut při 85 °C, pH bylo následně upraveno na hodnotu 7 pomocí

koncentrované HCl). Reakce byla zahájena přidáním 20 μl enzymového extraktu. Následovala inkubace po dobu 4 hodin (třepačka Thermal Shake lite; 37 °C; 300 RPM). Reakce byla zastavena přidáním 40 μl 25% (v/v) kyseliny trichloroctové a vzniklá sraženina byla odstředěna na stolní centrifuze MiniSpin při 12100 \times g po dobu 5 minut. Následně bylo do jamky mikrotitrační destičky přeneseno 40 μl supernatantu, k němuž bylo přidáno 160 μl 6% (w/v) Na_2CO_3 a 40 μl 25% (v/v) Folin-Cioalteaova činidla. Následně byla měřena absorbance při 750 nm. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních roztoků L-tyrosinu v rozsahu 55–400 μM . Blank byl připraven přidáním daného enzymového extraktu do reakční směsi již obsahující 40 μl 25% (v/v) kyseliny trichloroctové.

3.5.8.3 Stanovení aktivity proteas metodou s fluorescenčně značeným kaseinem

Stanovení proteolytické aktivity metodou s kaseinem značeným izokyanátem fluoresceinu je založeno na zvýšení celkové intenzity fluorescence vlivem hydrolýzy tohoto substrátu. Izokyanát fluoresceinu, který vystupuje současně jako donor i akceptor fluorescenčního přenosu FRET (z aj. fluorescence resonance energy transfer) vykazuje vlivem fragmentace kaseinu pokles zhášení fluorescence [85].

V rámci této metody byla stanovována aktivita proteas v půdě. Do mikrozkušavek s předem naváženou půdou o hmotnosti 5 mg bylo v triplikátech pipetováno 200 μl 100mM pufru Tris-HCl o pH = 7 a 200 μl pracovního roztoku (30 μl alikvotu zásobního roztoku fluorescenčně značeného substrátu; 15 ml 100mM pufru Tris-HCl o pH = 7). Zásobní roztok obsahující fluorescenčně značený substrát byl dle pokynů výrobce připraven rozpuštěním 2,5 mg substrátu v 500 μl ultračisté vody. Následně byl rozdělen na alikvoty po 30 μl , které byly uchovány při 20 °C. Reakční směs byla promíchána na vortexu a následovala inkubace po dobu 1 hodiny ve tmě (třepačka Thermal Shake lite; 30 °C; 900 RPM). Po ukončení inkubační doby byla půda odstředěna na stolní centrifuze MiniSpin při 12100 \times g po dobu 5 minut. Supernatant o objemu 200 μl byl přenesen do destičky (Corning 96 Flat Bottom Black Polystyrol) a byla změřena fluorescence ($\lambda_{\text{ex/em}} = 485/538 \text{ nm}$).

3.5.9 Stanovení aktivity fosfatas

Stanovení aktivity kyselých a alkalických fosfatas je založeno na odštěpení fosfátu z p-nitrofenylfosfátu (PNPP) v kyselém, potažmo alkalickém prostředí. Produktem reakce je žlutý p-nitrofenol [86].

3.5.9.1 Stanovení aktivity alkalických fosfatas v kořenech

Pro měření aktivity alkalických fosfatas touto metodou byly extrakty připraveny extrakcí kořenů v 250mM AMP-NaOH pufru o pH = 9 v souladu se stanoveným pH optimem viz Příprava materiálu pro analýzy. Do jamek mikrotitrační destičky bylo v triplicátech pipetováno vždy 20 μ l extraktu kořenů. Do každé jamky bylo dále přidáno 20 μ l 250mM AMP-NaOH pufru o pH = 9 a enzymová reakce byla zahájena přidáním 20 μ l 20mM PNPP. Nárůst absorbance spojený s průběhem enzymové reakce byl měřen kontinuálně při 405 nm při 30 °C po dobu 30 minut. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních roztoků p-nitrofenolu v rozsahu 20–500 μ M.

3.5.9.2 Stanovení aktivity alkalických fosfatas v půdě

Do mikrozkušavek s předem naváženou půdou o hmotnosti 5 mg bylo v triplicátech pipetováno 100 μ l 250mM AMP-NaOH pufru o pH = 9. Enzymová reakce byla zahájena přidáním 100 μ l 20mM PNPP. Reakční směs byla promíchána a následovala inkubace ve tmě po dobu: 40 minut – experiment 1, 30 min – experiment 2 a 3 (třepačka Thermal Shake lite; 30 °C; 850 RPM). Po ukončení inkubační doby byla půda odstředěna na stolní centrifuze MiniSpin při 12100 \times g po dobu 5 minut. Supernatant o objemu 60 μ l byl následně přenesen do destičky a byla měřena absorbance při 405 nm. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních roztoků p-nitrofenolu v rozsahu 5–150 μ M. Blank byl připraven přidáním daného enzymového extraktu do reakční směsi a okamžitým odstředěním bez inkubace.

3.5.9.3 Stanovení aktivity kyselých fosfatas v kořenech

Pro měření aktivity kyselých fosfatas v kořenech byly extrakty připraveny extrakcí v McIlvainově pufru o pH = 6 (0,1M kyselina citronová; 0,2M Na₂HPO₄) v souladu se stanoveným pH optimem viz Příprava materiálu pro analýzy. Do jamek mikrotitrační destičky bylo v triplicátech pipetováno vždy 20 μ l extraktu. Do každé jamky bylo dále přidáno 10 μ l McIlvainova pufru o pH = 6 a enzymová reakce byla zahájena přidáním 10 μ l 20mM PNPP. Reakční směs byla promíchána a následovala inkubace po dobu: 60 minut – experiment 1, 15 minut – experiment 2, 5 minut – experiment 3; pozn. čtyřikrát ředěný extrakt (Mini inkubátor Labnet; 30 °C). Po uplynutí inkubační doby byla reakce zastavena 80 μ l 250mM AMP-NaOH pufru o pH = 9 a roztok byl odstředěn na stolní centrifuze MiniSpin při 12100 \times g po dobu 5 minut. Supernatant o objemu 120 μ l byl následně přenesen do destičky a byla změřena absorbance při 405 nm. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních

roztoků p-nitrofenolu v rozsahu 20–500 μM . Blank byl připraven přidáním daného enzymového extraktu do reakční směsi již obsahující 80 μl zastavujícího pufru.

3.5.9.4 Stanovení aktivity kyselých fosfatů v půdě

Do mikroskopických s předem naváženou půdou o hmotnosti 5 mg bylo v triplicátech pipetováno 100 μl McIlvainova pufru o $\text{pH} = 6$ a enzymová reakce byla zahájena přidáním 100 μl 20mM PNPP. Reakční směs byla promíchána a následovala inkubace po dobu: 60 minut – experiment 1; 30 min – experiment 2 a 3 (třepačka Thermal Shake; 30 $^{\circ}\text{C}$; 850 RPM). Po uplynutí inkubační doby byla reakce zastavena 800 μl 250mM AMP-NaOH pufru o $\text{pH} = 9$ a roztok byl odstředěn na stolní minicentrifuze MiniSpin při 12100 \times g po dobu 5 minut. Supernatant o objemu 120 μl byl následně přenesen do destičky a byla změřena absorbance při 405 nm. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních roztoků p-nitrofenolu v rozsahu 20–500 μM . Blank byl připraven přidáním daného enzymového extraktu do reakční směsi již obsahující 800 μl zastavujícího pufru.

3.5.10 Stanovení aktivity β -1,3-glukanasy, celulasy a chitinasy

Stanovení aktivity endoglykosidas je založeno na vzniku nových redukcí konců, a tedy na detekci aldehydů pomocí tvorby aduktů reakcí s jednou molekulou MBTH v zásaditém prostředí, kdy je vznik aduktu podpořen zvýšením teploty. Ve druhém kroku probíhající v kyselém prostředí za působení oxidačního činidla dochází k navázání druhé molekuly MBTH. Ta způsobuje vznik zeleného zbarvení [87].

Aktivita endoglykosidas – β -1,3-glukanasy, celulasy a chitinasy, byla stanovována v roztocích biostimulantů a v extraktech půdy. Vzorky biostimulantů byly připraveny rozpuštěním v 100mM MOPS-NaOH pufru o $\text{pH} = 5$ v souladu s pH optimem viz Příprava materiálu pro analýzy. Vzorky půdy byly připraveny extrakcí 1 g půdy v 7 ml téhož pufru. Po 60minutové extrakci (třepačka Multitron Standard; 37 $^{\circ}\text{C}$) následovalo odstředění 1,5 ml vzorku při 12100 \times g na stolní centrifuze MiniSpin po dobu 10 minut.

Do mikroskopických bylo v triplicátech pipetováno 8 μl enzymového extraktu a 20 μl 100mM MOPS-NaOH pufru o $\text{pH} = 5$. Enzymová reakce byla zahájena přidáním 12 μl substrátu. Substráty o koncentraci 1,6 mg/ml pro stanovení endoglykosidas byly následující: laminarin (β -1,3-glukanasa), chitin (chitinasa), methyl-celulosa (celulasa). Následovala inkubace po dobu: 20 minut – charakterizace biostimulantů, 60 minut – půda experiment 3 (třepačka Thermal Shake; 37 $^{\circ}\text{C}$; 300 respektive 900 RPM). Po uplynutí inkubační doby byla reakce

zastavena přidáním 40 µl 0,5M NaOH. Dále bylo přidáno také 40 µl MBTH činidla (3 mg/ml MBTH a 1 mg/ml DTT v poměru 1 : 1), se kterým byl roztok inkubován dalších 15 minut (termoblok Elite; 80 °C). Po vychlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 80 µl Fe³⁺ činidla (0,5% (w/v) FeNH₄(SO₄)₂; 0,5% (w/v) kyselina sulfanilová; 0,25M HCl). Následně bylo do destičky pipetováno 100 µl vybarveného roztoku a byla změřena absorbance při 630 nm. Kalibrace metody byla zhotovena ze standardních roztoků glukosy v rozsahu 100–700 µM. Blank byl připraven přidáním daného enzymového extraktu do reakční směsi již obsahující 40 µl hydroxidu.

3.5.11 Nativní elektroforetická separace

Nativní elektroforetická separace umožňuje dělení proteinů v gelu podle náboje v nedenaturujícím prostředí. Díky tomu umožňuje zachování jejich enzymové aktivity, kterou je možné vizualizovat pomocí barvicích technik.

Mezi skla umístěná do elektroforetické aparatury byla nejprve pipetována směs na přípravu 10% (w/v) dělicího gelu. Směs o objemu 20 ml obsahovala: 7,9 ml demineralizované vody; 6,7 ml 30% (w/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu (29,2% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) bisakrylamid); 5 ml 1,5M Tris-HCl pufru o pH 8,8; 200 µl 10% (w/v) glycerolu; 8 µl TEMED a 200 µl 10% (w/v) peroxodisíranu amonného. Dělicí směs byla převrstvena demineralizovanou vodou a ponechána k polymeraci po dobu 30 minut při laboratorní teplotě.

Na polymerovaný dělicí gel byla následně pipetována směs na 5% (w/v) zaostřovací gel. Směs o objemu 10 ml obsahovala: 6,8 ml demineralizované vody; 1,7 ml 30% (w/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu; 1,25 ml 0,5M Tris-HCl pufru o pH 6,8; 100 µl 10% (w/v) glycerolu; 10 µl TEMED a 100 µl 10% (w/v) peroxodisíranu amonného přidaného těsně před přenesením směsi mezi skla. Ihned poté byl mezi skla vložen plastový hřeben, tvořící jamky pro nanesení vzorků. Zaostřovací gel byl ponechán k polymeraci po dobu 20 minut při laboratorní teplotě.

Polymerované polyakrylamidové gely byly umístěny do elektroforetické vany, která byla naplněna elektrodovým pufrem o pH 8,3 (250mM glycin; 25mM Tris; 0,1% (v/v) roztok glycerolu). Pro nativní elektroforetickou separaci byly extrakty listů a kořenů připraveny extrakcí v pufru o pH = 7,5 (100mM Tris-HCl; 5mM EDTA; 1mM DTT; 10mM askorbát) viz Příprava materiálu pro analýzy. Do jamek zaostřovacího gelu byl následně pipetován různý objem vhodně zředěných extraktů v 20% (w/v) roztoku sacharózy v rozsahu objemů 5–25 µl. Pipetovaný objem byl zvolen na základě obsahu proteinů v jednotlivých vzorcích, tak aby

v každé jamce byla stejná celková hmotnost proteinů (25 µg). Před zahájením elektroforézy bylo volně do prostoru vany přidáno 200 µl 0,1% (w/v) bromfenolové modři jakožto indikátoru konce elektroforézy. Dále byla aparatura připojena ke zdroji elektrického proudu a separace proteinů v zaostřovacím gelu probíhala při 70 V. Po přechodu proteinů do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

V gelu s elektroforeticky separovanými vzorky byly dále detekovány enzymové aktivity. Inkubační směsi se skládaly z jednoho či více následně přidávaných roztoků, které obsahovaly potřebné prostředí, substráty a barvicí složky. V barvicích roztocích byly gely ponechány do kompletního vybarvení. Isoformy jednotlivých enzymů a jejich relativní intenzita odpovídající enzymové aktivitě byla vyhodnocena pomocí programu GelAnalyzer. Isoformy byly číslovány vzestupně dle umístění v gelu.

3.5.11.1 Detekce aktivity celkových peroxidas

Inkubační směs pro detekci aktivity peroxidas obsahovala 18,8mM DAB v 96% (w/v) EtOH; 100mM fosfátový pufr pH = 7 a 388mM H₂O₂. Objem směsi pro barvení jednoho gelu činil 10 ml. Pro rozpouštění DAB byla využita sonikace (Sonikátor Sonixa Ultrasonic Cleaner) [88].

3.5.11.2 Detekce aktivity askorbátperoxidasy

Nejdříve probíhala inkubace v ekvilibračním pufru (50 mM fosfátový pufr o pH = 7; 2mM kyselina askorbová) po dobu 5 minut. Dále následovala inkubace v reakční směsi (50 mM fosfátový pufr o pH = 7; 4mM kyselina askorbová; 2mM peroxid vodíku) po dobu 20 minut. Gel byl následně promýván po dobu 1 minuty 50mM fosfátovým pufrem o pH = 7 a nakonec byl vložen do barvicí směsi (50mM Tris-HCl pufru o pH 7,8; 28mM TEMED a 2,45mM NBT) [88].

3.5.11.3 Detekce aktivity glutathion-S-transferasy

Nejdříve probíhala inkubace ve směsi I (100mM fosfátový pufr o pH = 6,5; 4,5mM redukovaná forma glutathionu; 1mM CDNB; 1mM NBT) po dobu 10 minut (Mini inkubátor Labnet; 37 °C). Tato směs byla chráněna před světlem. Po opláchnutí v demineralizované vodě následovala inkubace ve směsi II (100mM Tris-HCl pufr o pH = 9,6; 3 mM PMS) až do požadovaného vybarvení. Objem každého použitého roztoku pro 1 gel činil 10 ml [88].

3.5.11.4 Detekce aktivity NADPH-oxidasy

Inkubační směs pro detekci NADPH-oxidasy obsahovala 50mM Tris-HCl pufr o pH = 7,5; 0,2mM NBT; 0,1 mM MgCl₂; 1mM CaCl₂ a 0,2mM NADPH. Objem směsi pro barvení jednoho gelu činil 10 ml [89].

3.5.12 Elektroforetická separace proteinů v prostředí SDS

SDS elektroforetická separace umožňuje dělení proteinů v gelu dle molekulové hmotnosti. To je založeno na schopnosti SDS propůjčit denaturovaným proteinům jednotný záporný náboj.

Mezi skla elektroforetické aparatury byla pipetována směs k přípravě 12% (w/v) dělicího gelu, která obsahovala: 6 ml 30% (w/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu; 4,9 ml demineralizované vody; 3,8 ml 1,5M Tris-HCl o pH = 8,8; 150 μl 10% (w/v) SDS, 6 μl TEMED a 150 μl 10% (w/v) peroxidisíranu amonného. Po převrstvení demineralizovanou vodou byl gel ponechán polymerizovat po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Na dělicí gel byla následně pipetována směs k přípravě 5% (w/v) zaostřovacího gelu, která obsahovala: 670 μl 30% (w/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu; 2,7 ml destilované vody; 500 μl 0,5M Tris-HCl o pH = 6,8; 40 μl 10% (w/v) SDS; 4 μl TEMED a 40 μl 10% (w/v) peroxidisíranu amonného. Po vložení plastového hřebenu byl zaostřovací gel ponechán polymerovat po dobu 20 minut při laboratorní teplotě.

Pro elektroforetickou separaci byly biostimulanty převedeny do roztoku rozpuštěním v McIlvainově pufru o pH = 6,5 (1M kyselina citronová; 0,2M Na₂HPO₄) viz Příprava materiálu pro analýzy. Roztoky biostimulantů o objemu 20 ul byly následně smíchány s 20 μl dvakrát koncentrovaného redukčního pufru (2,4 ml demineralizované vody; 2,6 ml 0,5M Tris-HCl o pH = 6,8; 2 ml glycerolu; 2 ml 10% (w/v) SDS; 500 μl β-merkapt ethanolu a 500 μl 1% (w/v) bromfenolové modři) a následovala denaturace po dobu 5 minut (Termoblok Elite; 100 °C). Pipetovaný objem každého roztoku pro jeden gel činil 20 μl. Objem komerční standardní směsi proteinů byl 5 μl. Elektroforetická separace probíhala v prostředí elektrodového pufru o pH = 8,3 (124mM Tris; 0,95M glycin; 17mM SDS) nejprve při 70 V a po přechodu proteinů do dělicího gelu při 140 V. Po ukončení separace byly polypeptidy v gelu detekovány pomocí dusičnanu stříbrného.

3.5.12.1 Detekce proteinů pomocí dusičnanu stříbrného

Gel přes noc uchovaný ve fixačním roztoku (50% (v/v) ethanol; 12%(v/v) kyselina octová; 0,05% (v/v) formaldehyd) byl další den dvakrát během 20 min promyt 20% (v/v) roztokem

ethanolu. Následně byl inkubován po dobu 2 minut v senzitivizujícím roztoku (0,02% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Následovalo dvojnásobné krátké promytí demineralizovanou vodou. Poté byl gel vložen do čerstvého a v lednici vychlazeného barvicího roztoku (0,2% (w/v) AgNO_3 ; 0,076% (v/v) formaldehyd), ve kterém byl inkubován po dobu 20 minut. Po promytí větším objemem demineralizované vody po dobu 30 sekund byl gel vložen do vyvíjecího roztoku (6% (w/v) Na_2CO_3 ; 0,0004% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,05% (v/v) formaldehyd), který byl ihned zase vylit a nahrazen dalším čerstvým vyvíjecím roztokem. V tomto roztoku byl gel ponechán do vybarvení a vyvíjení bylo následně ukončeno terminačním roztokem (12% (v/v) kyselina octová), v němž byl gel ponechán až do ukončení unikání bublinek [79].

3.5.13 Tricinová elektroforetická separace peptidů

Tricinová SDS elektroforetická separace je metoda vhodná k dělení proteinů v rozsahu 1–100 kDa a umožňuje tak rozlišení proteinů menších než 30 kDa. Separace je prováděna v systému tris-tricinových pufrů [90].

Nejprve byla mezi skla elektroforetické aparatury pipetována směs k přípravě 16% (w/v) gelu, která obsahovala: 5 ml 49,5% (w/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu (48 % (w/v) akrylamid; 1,5% (w/v) bisakrylamid); 5 ml 1M Tris-HCl o pH = 8,45 v 0,3% (w/v) SDS; 10% (w/v) glycerol; 15 ml demineralizované vody; 50 μl 10% (w/v) peroxidisíranu amonného a 5 μl TEMED. Dělicí gel byl po převrstvení demineralizovanou vodou ponechán polymerovat po dobu 30 minut (Mini inkubátor Labnet; 50 °C). Na polymerovaný dělicí gel byla následně pipetována směs na 4% (w/v) zaostřovací gel, která byla složena z: 0,5 ml 49,5% (w/v) směsi akrylamidu a bisakrylamidu (48 % (w/v) akrylamid; 1,5% (w/v) bisakrylamid); 1,5 ml 1M Tris-HCl o pH = 8,45 v 0,3% (w/v) SDS; 6 ml demineralizované vody; 45 μl 10% (w/v) peroxidisíranu amonného a 4,5 μl TEMED. Zaostřovací gel byl po vložení plastového hřebene ponechán polymerovat po dobu 20 minut (Mini inkubátor Labnet; 50 °C).

Pro tricinovou SDS elektroforetickou separaci byly biostimulanty převedeny do roztoku rozpuštěním v McIlvainově pufru o pH = 6,5 (1M kyselina citronová; 0,2M Na_2HPO_4) viz Příprava materiálu pro analýzy. Ke 300 μl extraktu bylo přidáno 100 μl vzorkového pufru (12% (w/v) SDS (w/v); 6% (w/v) merkptoethanol; 30% (w/v) glycerol; 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250; 150mM Tris-HCl o pH = 7) a následovala denaturace po dobu 5 minut (Termoblok Elite; 100 °C). Pipetovaný objem každého použitého roztoku pro jeden gel činil 20 μl . Objem komerční standardní směsi polypeptidů byl 5 μl . Elektroforéza probíhala v prostředí katodového (0,1M Tris-tricinový pufr o pH = 8,25) a anodového pufru (0,1M

Tris-HCl pufr o pH = 8,9). Napětí bylo nejprve nastaveno na 30 V a po kompletním přechodu proteinů do dělicího gelu bylo zvýšeno na 140 V. Po ukončení separace byly polypeptidy v gelu detekovány pomocí dusičnanu stříbrného viz Elektroforetická separace proteinů.

3.5.14 Lyofilizace

Pro určení obsahu sušiny v listech a kořenech pomocí lyofilizace byly vyhrazeny jednotlivé alikvoty odebraných listů (1–1,5g) a kořenů (0,2–0,3 g), které byly vždy přeneseny do předem zvážené skleněné lahvičky. Váha listů a kořenů byla stanovena na čtyři desetinná místa z difference. Zvážené lahvičky byly překryty parafilmem s vytvořenými otvory a byly vloženy do lahví určených pro lyofilizaci. Lyofilizace probíhala přes noc na přístroji Lyovac GT 2 E.

3.5.15 Stanovení relativního obsahu vody v listech

Z listů odebraných z rostlin kukuřice experimentu 2 a 3 byly odebrány 4 řezy o obsahu 1,5 cm². Ty byly následně zváženy na analytických vahách a byla zaznamenána čerstvá hmotnost (FW). Řezy byly dále ponořeny do ledově chladné demineralizované vody a byly v ní ponechány při 4 °C po dobu 4 hodin, po jejímž uplynutí byly znovu zváženy. Tato hmotnost byla zaznamenána jako hmotnost po nasycení vodou (TW). Řezy listů byly nakonec přeneseny do suchých mikrozkupek a byly sušeny při 70 °C po dobu 48 hodin. Hmotnost zaznamenaná po vysušení byla zaznamenána jako suchá váha (DW). Ze získaných hodnot byl vypočten relativní obsah vody v listech [91]. Výpočet byl relativního obsahu vody (RWC) v listech byl proveden pomocí následujícího vzorce (1).

$$RWC = \frac{(FW - DW)}{(TW - DW)} \times 100$$

(1) Vzorec pro výpočet relativního obsahu vody v listech. RWC ... relativní obsah vody (g); FW ... čerstvá hmotnost (g); TW ... hmotnost listu po nasycení demineralizovanou vodou (g); DW ... hmotnost sušiny (g).

3.5.16 Statistické vyhodnocení

Výsledky zahrnující porovnání více experimentálních skupin rostlin kukuřice byly vyhodnoceny s použitím testu One Way ANOVA v programu SigmaPlot 12.5 Holm-Sidakovou metodou. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p > 0,050$.

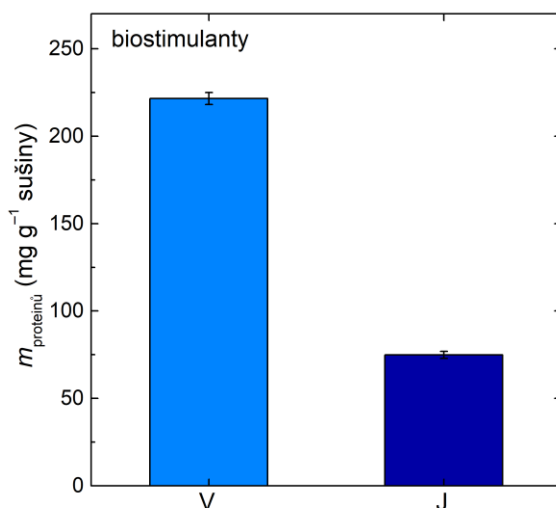
4 Výsledky

4.1 Charakteristika biostimulantů

V rámci této práce byl zkoumán vliv vybraných biostimulantů přírodního původu – kopřivové jíchy a výluhu z vermikompostu na růst, metabolismus, a především antioxidační systém rostlin kukuřice. Biostimulanty byly charakterizovány z hlediska obsahu proteinů, antioxidačních vlastností a aktivit degradačních enzymů.

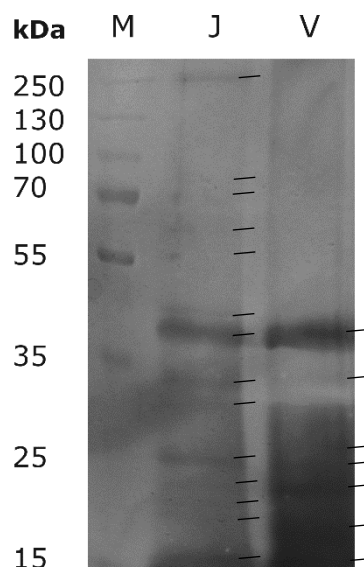
4.1.1 Obsah proteinů v kopřivové jíše a výluhu z vermikompostu

Obsah proteinů byl ve výluhu z vermikompostu stanoven na 220 mg proteinů na gram sušiny. V kopřivové jíše byl zjištěn obsah proteinů 75 mg na gram sušiny. Výsledky shrnuje následující Obr. 6.



Obr. 6 Obsah proteinů stanovený v biostimulantech metodou dle Lowryho. Množství proteinů je vyjádřeno jako hmotnost proteinů na gram sušiny biostimulantů. **Zkratky:** výluh z vermikompostu (V), kopřivová jícha (J).

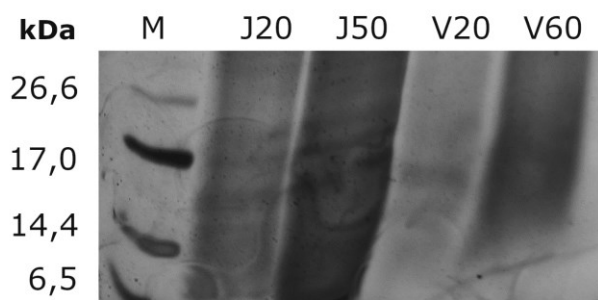
Proteiny obsažené v biostimulantech byly dále charakterizovány pomocí elektroforetické separace. Větší distribuce molekulových hmotností proteinů byla přítomná v kopřivové jíše. Zde byly oproti výluhu z vermikompostu lépe patrné proteiny větší než 50 kDa, výrazný byl zejména proužek přibližně odpovídající 250 kDa. Naopak u výluhu z vermikompostu nebyly pozorovány proteiny větší než 40 kDa. Intenzita proužků, splývajících od 30 kDa níže v pás, byla však oproti kopřivové jíše u výluhu z vermikompostu výraznější. U obou biostimulantů však byla pozorována přítomnost proužků značících přítomnost polypeptidů menších než 20kDa. Společným rysem obou biostimulantů byl výrazný proužek v oblasti odpovídající asi 40kDa. Výsledky shrnuje Obr. 7 na následující straně.



Obr. 7 Elektroforetická separace proteinů v biostimulantech. Separace probíhala v 12% (w/v) polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí SDS. Dráha M označuje komerčně dostupný marker molekulových hmotností.

Zkratky: výluh z vermikompostu (V), kopřivová jícha (J).

Vzhledem k výsledkům elektroforetické separace proteinů byla testována také přítomnost polypeptidů menších než 30 kDa pomocí tricínové SDS elektroforézy. Tou byla srovnáním s použitým standardem zjištěna přítomnost polypeptidů v rozsahu 15–20 kDa u obou biostimulantů, což odpovídalo přechozím zjištěním. Nalezené množství polypeptidů bylo však v tomto případě výraznější v kopřivové jíše, kde byly rozpoznatelné především 3 definované proužky. Naproti tomu u výluhu z vermikompostu bylo možné pozorovat zejména 1 definovaný proužek. Výsledky shrnuje následující Obr. 8.

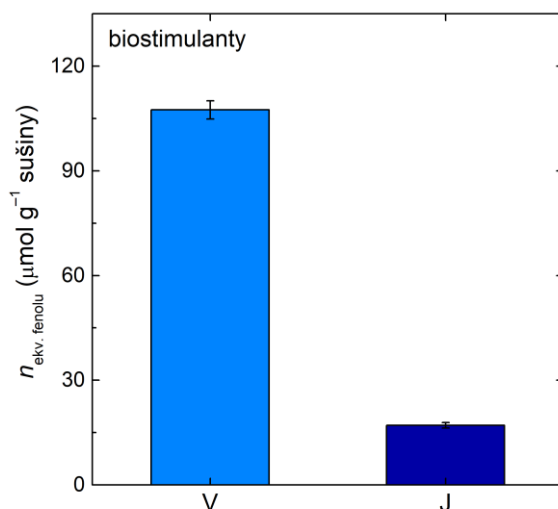


Obr. 8 Elektroforetická separace polypeptidů v biostimulantech. Separace v 16% (w/v) polyakrylamidovém gelu byla provedena v denaturujícím prostředí v systému tris-tricínových pufrů. Dráha M označuje komerčně dostupný marker molekulových hmotností. Čísla za označením drah písmeny J a V značí použitou koncentraci extraktu daného biostimulantu (např. J20 značí extrakt lyofilizátu kopřivové jíchy o koncentraci 20 g/l).

Zkratky: výluh z vermikompostu (V), kopřivová jícha (J).

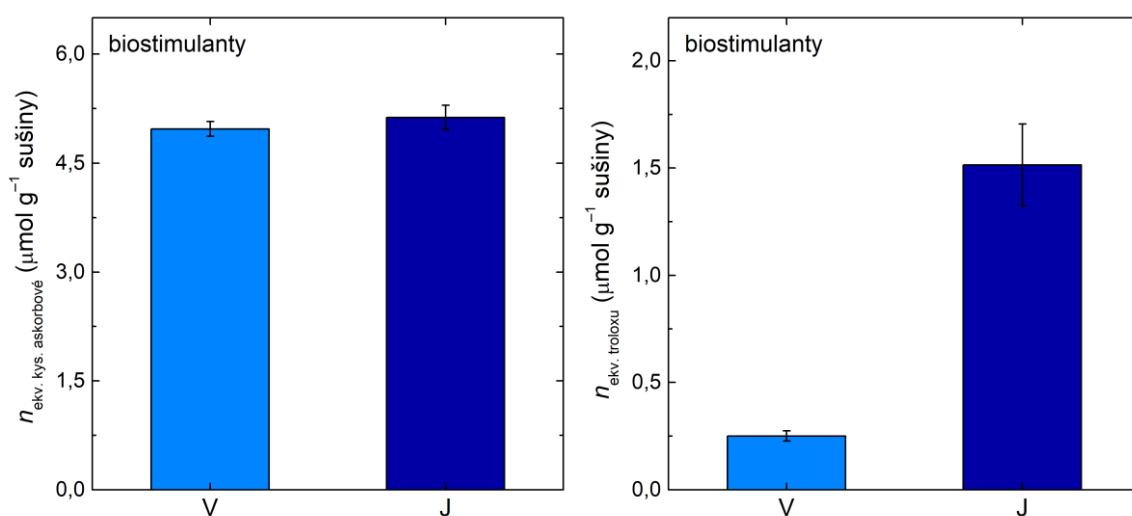
4.1.2 Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita v kopřivové jíše a výluhu z vermikompostu

Obsah fenolických látek byl ve výluhu z vermikompostu stanoven na 108 μmol ekv. fenolu na gram sušiny. V kopřivové jíše byl zjištěn obsah fenolických látek 17 μmol ekv. fenolu na gram sušiny. Výsledky shrnuje následující Obr. 9.



Obr. 9 Obsah fenolických látek stanovený v biostimulantech metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Množství fenolických látek je vyjádřeno jako látkové množství ekv. fenolu na gram sušiny biostimulantů. **Zkratky:** výluh z vermikompostu (V), kopřivová jícha (J).

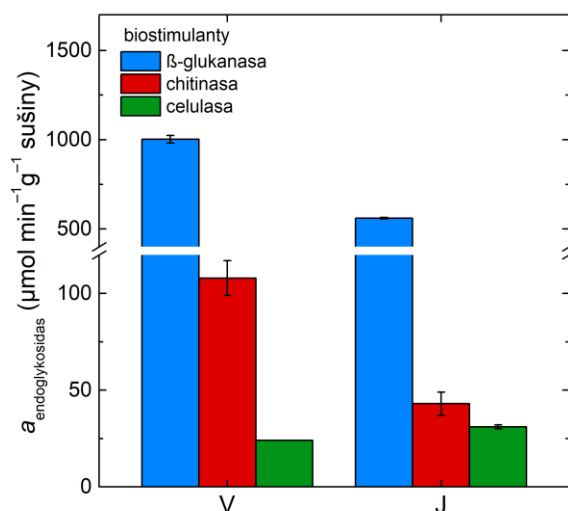
Výsledky stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP byly v případě obou biostimulantů téměř totožné. Obsah fenolických látek, který k antioxidační kapacitě obvykle významně přispívá byl však u kopřivové jíchy nižší. Naopak antioxidační kapacita stanovená metodou DPPH byla naopak nižší u výluhu z vermikompostu. Výsledky shrnuje následující Obr. 10.



Obr. 10 Vlevo: Antioxidační kapacita biostimulantů stanovená metodou FRAP. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako látkové množství ekv. kyseliny askorbové vztažené na gram sušiny biostimulantů. **Vpravo:** Antioxidační kapacita extraktů biostimulantů stanovená metodou DPPH. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako látkové množství ekv. troloxu vztažené na gram sušiny biostimulantů. **Zkratky:** výluh z vermikompostu (V), kopřivová jícha (J).

4.1.3 Aktivita β -1,3-glukanasy, celulasy a chitinasy v kopřivové jíše a výluhu z vermikompostu

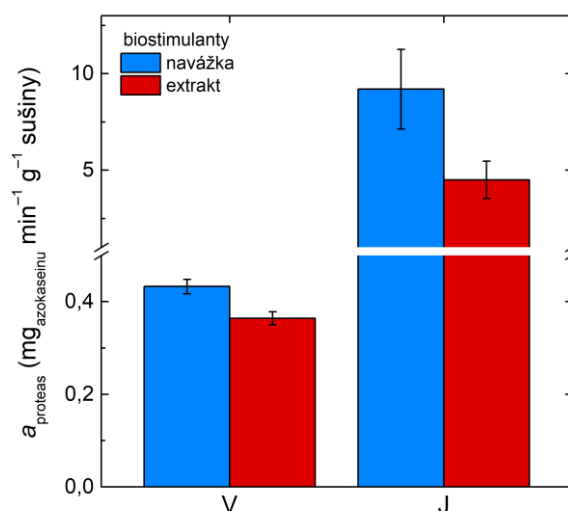
V roztocích biostimulantů byla dále testována aktivita endoglykosidas – jmenovitě enzymů β -1,3-glukanasy, chitinasy a celulasy. Nejvyšší aktivita byla naměřena v případě β -1,3-glukanasy, přičemž aktivita stanovená v extraktu výluhu z vermikompostu byla asi dvakrát vyšší než v kopřivové jíše. Také aktivita chitinasy byla asi dvakrát vyšší u výluhu z vermikompostu, ovšem aktivita celulasy byla v případě obou biostimulantů srovnatelná. Výsledky shrnuje následující Obr. 11.



Obr. 11 Aktivita endoglykosidas – β -1,3-glukanasy, chitinasy a celulasy detekovaná v roztocích biostimulantů. Enzymová aktivita je vyjádřena jako redukční ekv. látkového množství glukosy vzniklý za minutu vztážený na gram sušiny biostimulantů. **Zkratky:** výluh z vermikompostu (V), kopřivová jícha (J).

4.1.4 Aktivita proteas v kopřivové jíše a výluhu z vermikompostu

Aktivita proteas byla stanovována v reakční směsi obsahující buď roztoky nebo přímo lyofilizáty biostimulantů. Aktivita stanovená oběma způsoby byla výrazně vyšší u kopřivové jíchy – asi patnáctkrát v případě použití roztoků biostimulantů a asi dvacetkrát v případě přidání lyofilizovaných biostimulantů do reakční směsi. U obou biostimulantů se projevil nárůst aktivity při použití lyofilizátu místo roztoku. Toto porovnání bylo provedeno za účelem zjištění možné adsorpce enzymů na nerozpuštěné částice biostimulantů. Podobný přístup byl dále využit při stanovení enzymových aktivit ve vzorcích půdy v experimentech s rostlinami. Výsledky shrnuje Obr. 12 na následující straně.



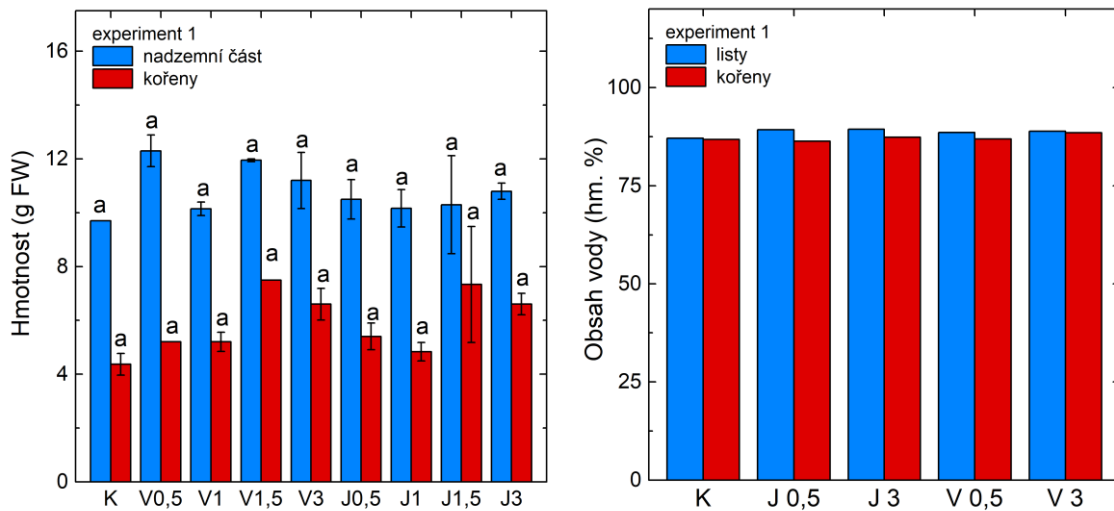
Obr. 12 Aktivita proteas stanovená metodou s azokaseinem v extraktech z biostimulantů v porovnání s navážkou biostimulantů v reakční směsi. Enzymová aktivita je vyjádřena jako hmotnost azokaseinu přeměněného za minutu jedním gramem sušiny biostimulantů. **Zkratky:** výluh z vermikompostu (V), kopřivová jícha (J).

4.2 Vliv biostimulantů na rostliny kukuřice experimentu 1

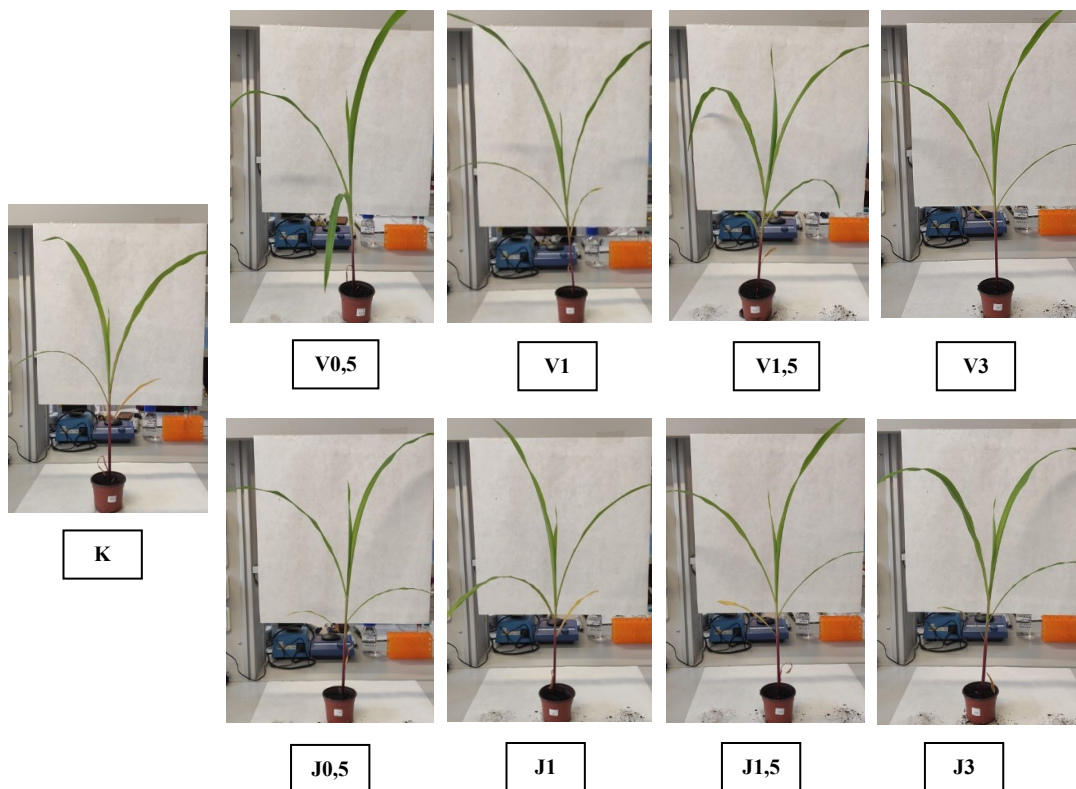
4.2.1 Charakterizace rostlin kukuřice

V další části práce byly oba biostimulanty aplikovány ve formě zálivky do půdy rostlin kukuřice. Vhodná koncentrace lyofilizátů biostimulantů byla testována v experimentu 1. Původní odhad pro koncentraci lyofilizátu kopřivové jíchy vhodné pro zálivku do půdy vycházel z návodu pro přípravu fermentované zálivky ze sušených kopřivových pelet firmy Neudorff [92], kde doporučená koncentrace činila 15 g pelet na 1 litr vody. Tuto fermentovanou směs bylo doporučeno před aplikací desetkrát zředit. V rámci optimalizace byl v prvním experimentu použit rozsah koncentrací 0,5–3 g/l. Převzat byl také doporučený objem aplikované zálivky, který byl 20 ml na 200 cm². Stejný koncentrační rozsah byl použit v případě lyofilizátů kopřivové jíchy i výluhu z vermikompostu, vzhledem k tomu že z dostupných zdrojů bylo v případě tekutých preparátů zjištěno podobné doporučené ředění pro přípravu zálivky.

Růstové parametry rostlin kukuřice ošetřené výluhem z vermikompostu a kopřivovou jíchou nevykazovaly statisticky významnou změnu oproti kontrolní skupině. Změna nebyla pozorována ani v případě obsahu vody stanoveném v listech a kořenech pomocí lyofilizace, jak ilustruje Obr. 13 na následující straně. Také vzhled rostlin, zachycený na Obr. 14 na následující straně, byl srovnatelný.



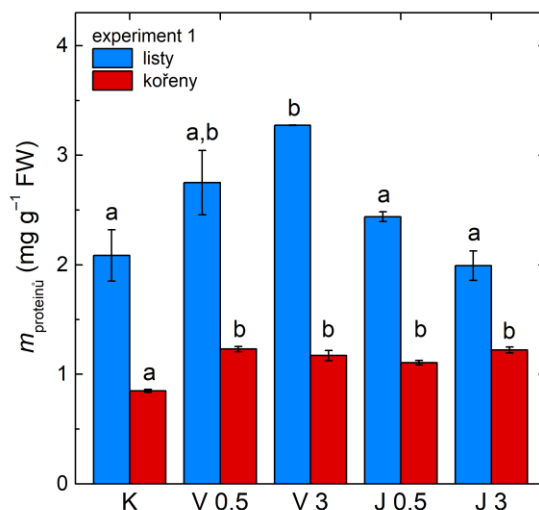
Ob. 13 Vlevo: Růstové parametry rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 1. Hmotnost rostlinných částí je vztažena na čerstvou hmotnost (FW). Vpravo: Obsah vody v listech a kořenech rostlin kukuřice zjištěný lyofilizací. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).



Ob. 14 Rostliny kukuřice pěstované v rámci experimentu 1 po 24 dnech od vysazení. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

4.2.2 Obsah proteinů v rostlinách kukuřice ošetřených biostimulanty

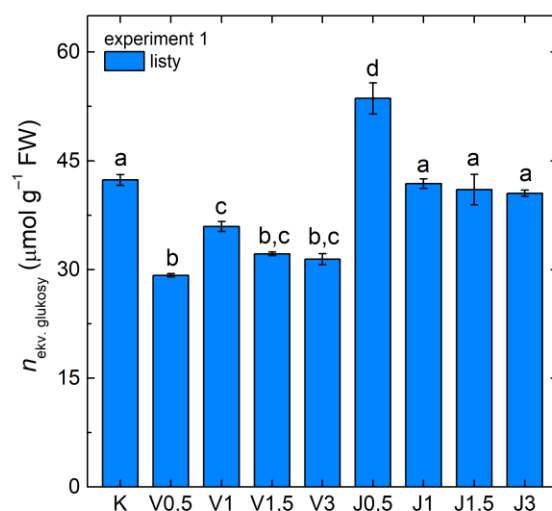
Obsah proteinů byl stanoven v extraktech z listů a kořenů. V listech rostlin ošetřených výluhem z vermikompostu byl oproti kontrole pozorován statisticky významný nárůst obsahu proteinů ve většině skupin. V případě skupin ošetřených kopřivovou jíchou však nedošlo v tomto koncentračním rozsahu k výraznější změně. Naopak obsah proteinů zjištěný v kořenech se u všech skupin ošetřených biostimulanty oproti kontrole zvýšil. Výsledky shrnuje následující Obr. 15.



Obr. 15 Obsah proteinů v extraktech z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 1 stanovený metodou dle Bradforda. Množství proteinů je vyjádřeno jako hmotnost proteinů vztažených na gram čerstvé hmotnosti (FW) rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

4.2.3 Celkový obsah sacharidů v rostlinách ošetřených biostimulanty

Celkový obsah sacharidů byl stanoven v extraktech z listů. Statisticky významný pokles byl pozorován v porovnání s kontrolou i skupinami ošetřenými jíchou v případě listů rostlin ošetřených výluhem z vermikompostu. Zjištěný obsah sacharidů v listech rostlin ošetřených jíchou byl až na výjimku, kterou byla skupina J0,5, srovnatelný s kontrolní skupinou. Výsledky shrnuje Obr. 16 na následující straně.

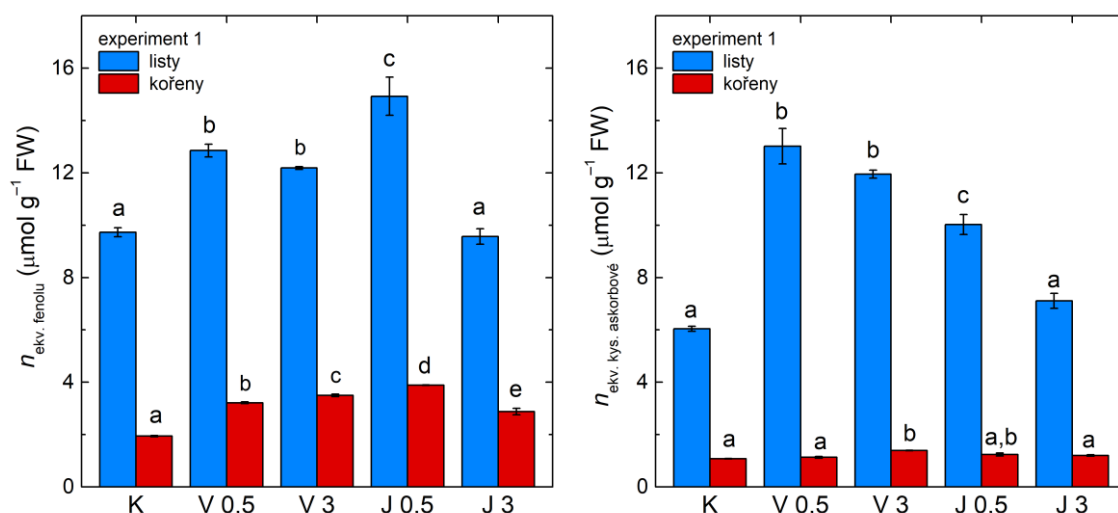


Obr. 16 Obsah celkových sacharidů v extraktech z listů rostlin kukuřice experimentu 1 stanovený metodou dle Duboise. Množství sacharidů je vyjádřeno jako látkové množství ekv. glukosy vztahené na gram čerstvé hmotnosti listů (FW). **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

4.2.4 Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita v rostlinách ošetřených biostimulanty

Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita byly stanoveny v extraktech z listů a kořenů. Množství fenolických látek bylo oproti kontrole zvýšené v listech rostlin ošetřených výluhem z vermikompostu. V rostlinách ošetřených kopřivovou jíchou byl sice nárůst oproti kontrole pozorován v případě skupiny J0,5, ale výsledky skupiny J3 byly srovnatelné s kontrolou. Zvýšený obsah fenolických látek byl zjištěn v kořenech všech rostlin ošetřených biostimulanty.

Výsledky antioxidační kapacity v listech korespondovaly s obsahem zjištěných fenolických látek. I zde došlo ke zvýšení antioxidační kapacity v listech rostlin ošetřených výluhem z vermikompostu oproti kontrole. V listech rostlin ošetřených kopřivovou jíchou došlo k nárůstu antioxidační kapacity opět jen v případě skupiny J0,5, zatímco skupina J3 byla srovnatelná s kontrolou. Vedle toho antioxidační kapacita stanovená v kořenech byla zvýšena oproti kontrole pouze v případě skupiny V3. Obsah fenolických látek a antioxidační kapacitu shrnuje Obr. 17 na následující straně.

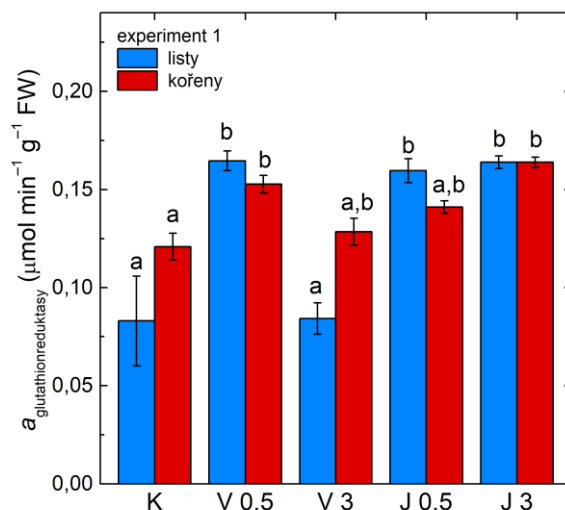


Obr. 17 Vlevo: Obsah fenolických látek v extraktech z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 1 stanovený metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Množství fenolických látek je vyjádřeno jako látkové množství ekv. fenolu na gram čerstvé hmotnosti (FW) rostlinného materiálu. **Vpravo:** Antioxidační kapacita extraktů z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 1 stanovená pomocí metody FRAP. Antioxidační kapacita byla vyjádřena jako μmol ekv. kyseliny askorbové na gram čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

4.2.5 Aktivita vybraných enzymů v rostlinách ošetřených biostimulanty

4.2.5.1 Aktivita glutathionreduktasy v rostlinách ošetřených biostimulanty

Aktivita glutathionreduktasy byl stanovena v extraktech listů a kořenů. Její aktivita v listech byla oproti kontrole zvýšená v rostlinách ošetřených kopřivovou jíchou. V případě listů rostlin ošetřených výluhem z vermikompostu došlo k nárůstu aktivity ve skupině V0,5, zatímco aktivita skupiny V3 byla srovnatelná s kontrolou. Aktivita glutathionreduktasy v kořenech vykazovala podobný trend jako v listech, avšak v případě skupin rostlin ošetřených jíchou došlo ke statisticky významné změně pouze u skupiny J3 oproti kontrole. Výsledky shrnuje Obr. 18 na následující straně.

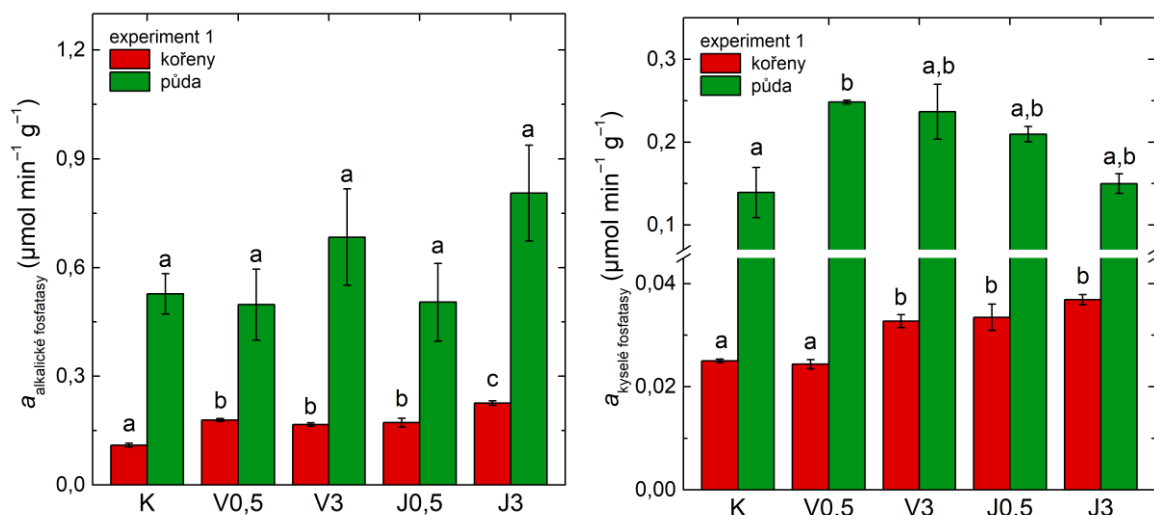


Obr. 18 Aktivita glutathionreduktasy detekovaná v extraktech z listů a kořenů. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství NADPH přeměněného za minutu jedním gramem čerstvé hmotnosti (FW) rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

4.2.5.2 Aktivita fosfatas v rostlinách ošetřených biostimulanty

Aktivita alkalických a kyselých fosfatas byla stanovena v kořenech a půdě. Aktivita alkalických fosfatas v kořenech byla zvýšená ve všech skupinách rostlin ošetřených biostimulanty oproti kontrole a v případě skupiny J3 byla o něco vyšší než v ostatních skupinách. Vedle toho v půdě nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny. Stanovená aktivita alkalických fosfatas v půdě byla také ve srovnání s aktivitou zjištěnou v kořenech o něco vyšší.

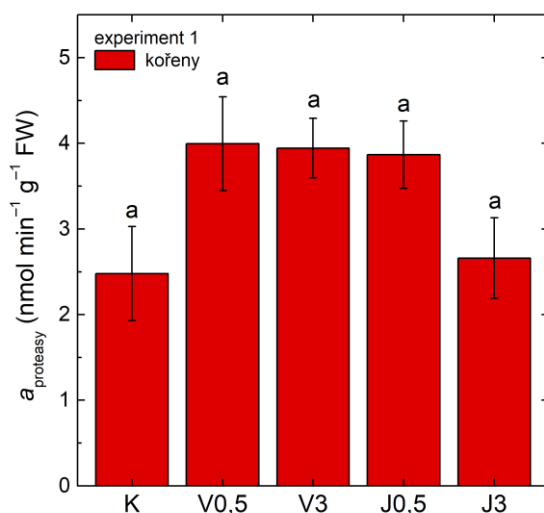
Podobně také aktivita kyselých fosfatas v kořenech byla ve většině skupin ošetřených biostimulanty zvýšená oproti kontrole. Naopak v případě půdy nebyla ve většině skupin pozorována statisticky významná změna aktivity až na skupinu V0,5, kde byl pozorován nárůst oproti kontrole. Aktivita kyselých fosfatas byla také řádově vyšší v půdě ve srovnání s aktivitou zjištěnou v kořenech. Výsledky shrnuje Obr. 19 na následující straně.



Obr. 19 Aktivita alkalických (vlevo) a kyselých fosfatasy (vpravo) detekovaná v reakční směsi obsahující extrakt z kořenů nebo vzorek půdy. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství PNPP přeměněného za minutu jedním gramem čerstvé hmotnosti (FW) kořenů nebo sušiny půdy. Toto stanovení bylo provedeno v rámci experimentu 1. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

4.2.5.3 Aktivita proteas v rostlinách ošetřených biostimulanty

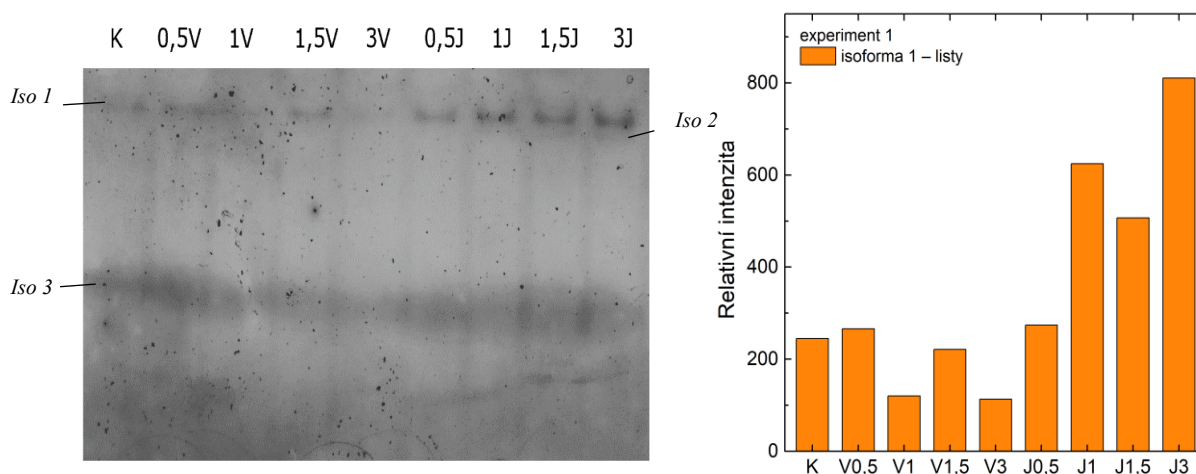
Aktivita proteas byla stanovena v extraktech z kořenů s pomocí kaseinu. Tato metoda byla použita vzhledem k vyšší citlivosti v porovnání s metodou využívající azokasein. Přestože skupiny ošetřené výluhem z vermikompostu i skupina J0,5 vykazovaly ve srovnání s kontrolní skupinou určitý nárůst proteolytické aktivity, tyto rozdíly nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné. Výsledky shrnuje následující Obr. 20.



Obr. 20 Aktivita proteas detekovaná v extraktech kořenů rostlin kukuřice experimentu 1. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství kaseinu přeměněného za minutu jedním gramem čerstvé hmotnosti (FW) kořenů. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

4.2.5.4 Aktivita celkových peroxidas v rostlinách ošetřených biostimulanty

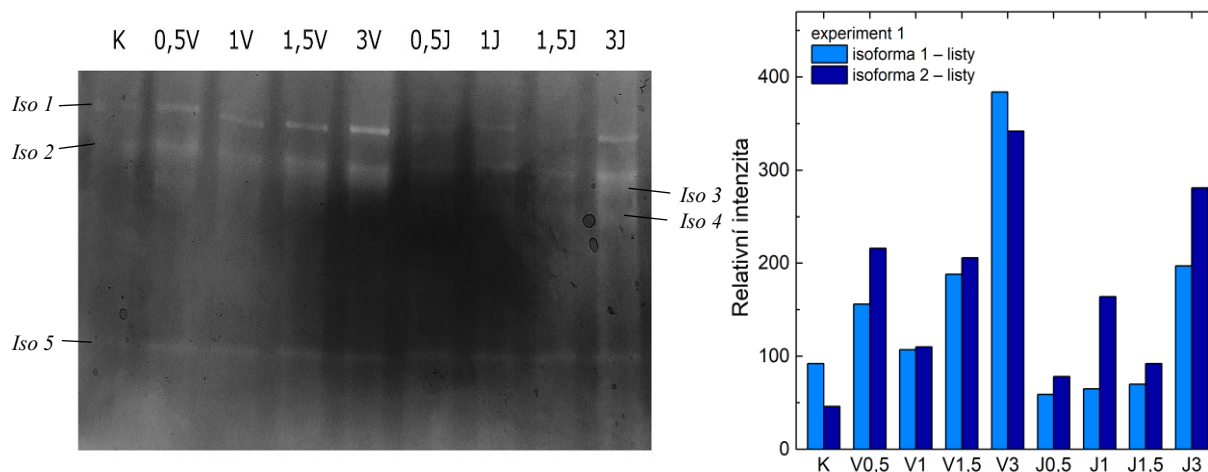
Po nativní elektroforetické separaci byly identifikovány celkem 3 rozlišitelné isoformy peroxidas v listech kukuřice. Aktivita isoformy 1, byla všeobecně nižší v kontrolní skupině a skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu. Naopak u skupin ošetřených jíchou došlo k nárůstu aktivity se vrůstající použitou koncentrací. S rostoucí koncentrací jíchy bylo také možné pozorovat nárůst intenzity zbarvení proužku zobrazujícího isoformu 2. V případě isoformy 3 nebyly patrné žádné výrazné změny. Výsledky shrnuje následující Obr. 21.



Obr. 21 Vlevo: Aktivita peroxidas extrahovaných z listů rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 1. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami.

Vpravo: Grafické znázornění aktivity peroxidas – isoformy 1. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

V listech byla detekována aktivita celkem 5 rozlišitelných isoform askorbátperoxidasy. Aktivita isoform 1 a 5 byla nejnižší v kontrolní skupině. Zatímco aktivita isoformy 5 byla oproti kontrole zvýšená, tak v rámci skupin ošetřených biostimulanty se nelišila. V případě isoformy 1 bylo možné pozorovat výraznější změny aktivity v rámci všech těchto skupin. Nejvyšší aktivita isoformy 1 byla patrná ve skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu, přičemž docházelo k jejímu zvýšení s rostoucí koncentrací. Výrazně zvýšená byla oproti kontrole také aktivita isoformy 1 ve skupině J3. Ve skupinách ošetřených vyšší koncentrací jíchy byla zvýšená také aktivita isoformy 3. Ve skupinách ošetřených jíchou bylo navíc možné pozorovat i další proužky odpovídající isoformě 4. Výsledky shrnuje Obr. 22 na následující straně.



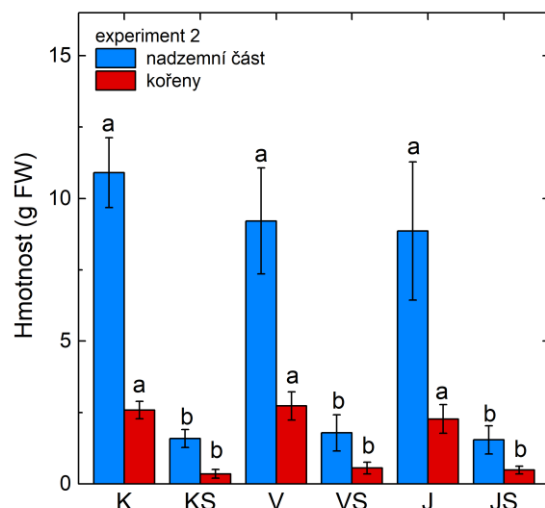
Obr. 22 Vlevo: Aktivita askorbátperoxidasy extrahované z listů rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 1. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šípkami. **Vpravo:** Grafické znázornění aktivity askorbátperoxidasy – isoformy 1 a 2. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou v rozsahu koncentrací 0,5–3 g/l (J).

Výše popsaný nárůst aktivity peroxidas a askorbátperoxidasy v listech pocházejících z rostlin kukuřice experimentu 1, byl indikátorem vlivu obou biostimulantů na antioxidační systém rostlin. Tento efekt vzrůstal při ošetření vyšší koncentrací biostimulantu. Především na základě těchto výsledků, proto bylo rozhodnuto v dalších experimentech použít k ošetření rostlin jejich vyšší koncentraci. Zvolena byla zálivka o stejném objemu jako v experimentu 1, ale o koncentraci 20 g/l.

4.3 Vliv biostimulantů na rostliny kukuřice vystavené suchu v experimentu 2

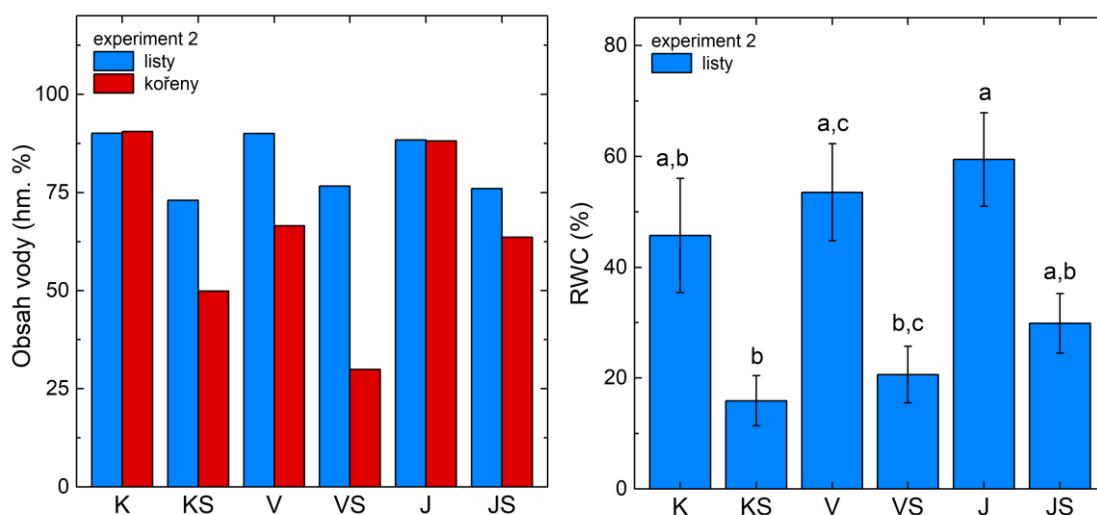
4.3.1 Charakterizace rostlin kukuřice vystavených suchu

V rámci experimentu 2 byl testován efekt ošetření kopřivovou jíchou a výluhem z vermikompostu o koncentraci 20 g/l na rostliny kukuřice vystavené stresu suchem po dobu 8 dnů oproti nestresovaným skupinám a kontrole. Sucho se výrazně projevilo také na růstových parametrech, ačkoliv statisticky významné změny v rámci skupin zjištěny nebyly. Výsledky zobrazuje Obr. 24 na následující straně.



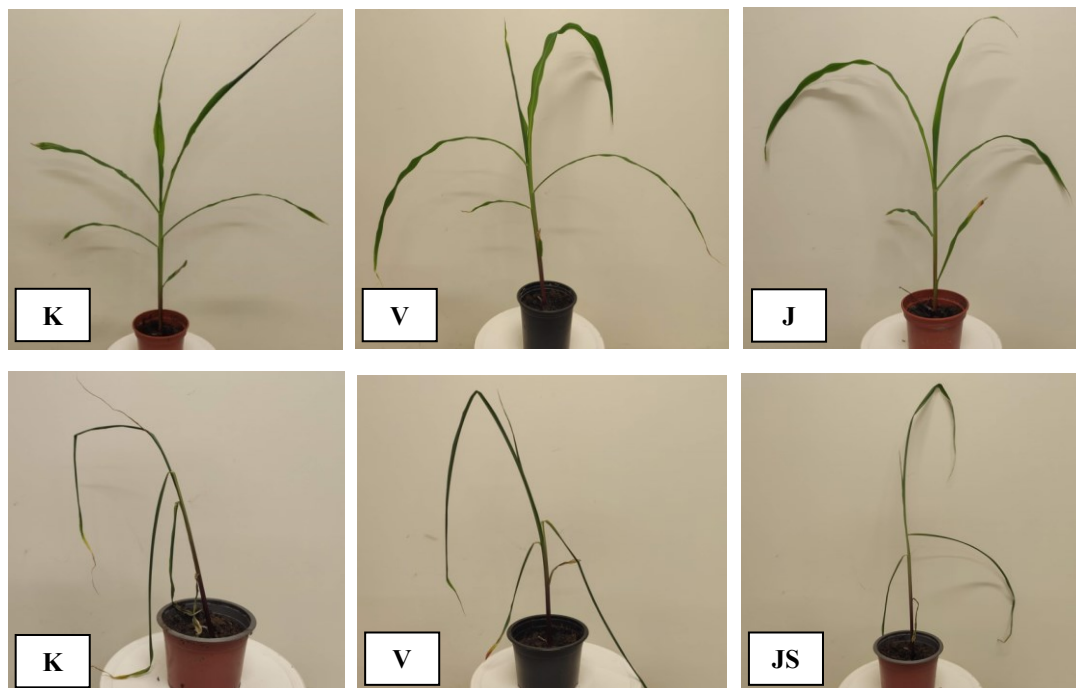
Obr. 24 Růstové parametry rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2. Hmotnost rostlinných částí je vztažena na čerstvou hmotnost (FW). **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

Dále byl v listech a kořenech rostlin kukuřice stanoven obsah vody. Pomocí lyofilizace bylo zjištěno, že v kořenech došlo ke změně obsahu vody především u skupin ošetřených výluhem z vermikompostu, a to i u rostlin nevystavených suchu. Naopak rostliny skupiny JS oproti skupině KS v kořenech zadržely více vody. V listech rostlin vystavených suchu došlo u všech skupin ke srovnatelnému poklesu obsahu vody. Obsah vody v listech byl také stanoven pomocí metody RWC. Tou bylo zjištěno zvýšení obsahu vody v listech vystavených suchu po ošetření biostimulanty. Výsledky zobrazuje následující Obr. 23.



Obr. 23 Vlevo: Obsah vody v listech a kořenech rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2 zjištěný lyofilizací. **Vpravo:** Relativní obsah vody v listech zjištěný pomocí metody RWC. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

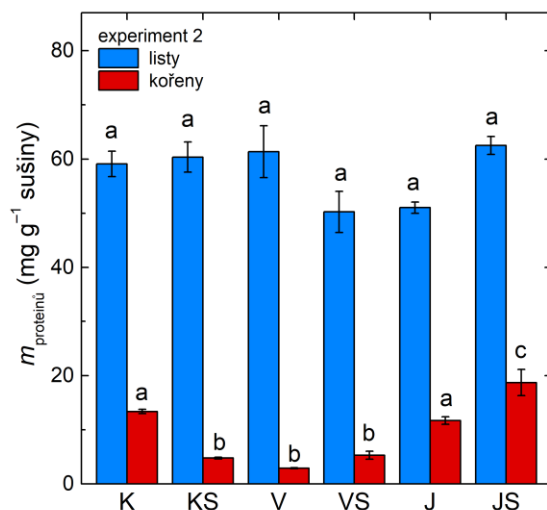
Vzhled rostlin ošetřených biostimulanty se nijak výrazně neliší od rostlin kontrolních, jak u rostlin stresovaných suchem, tak i v rostlinách s dostatečnou závlivkou. V případě skupin vystavených suchu po dobu 8 dnů byla pozorována výrazná ztráta turgoru. Výsledky shrnuje následující Obr. 25.



Obr. 25 Rostliny kukuřice pěstované v rámci experimentu 2 po 21 dnech od vysazení. Rostliny vystavené suchu neměly po dobu 8 dnů přístup k závlaze. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.3.2 Obsah proteinů v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Obsah proteinů byl stanoven v extraktech z listů a kořenů. Stanovený obsah v listech nevykazoval v rámci skupin statisticky významnou změnu. Vedle toho množství proteinů v kořenech klesalo u kontrolních skupin se suchem a naopak vzrůstalo u skupin ošetřených biostimulanty. Tento nárůst však nebyl v případě skupin ošetřených výluhem z vermikompostu statisticky významný a množství zjištěných proteinů bylo u těchto skupin všeobecně nižší. Naopak stanovené množství proteinů v kořenech v případě skupin ošetřených jíchou se suchem významně vzrostlo a bylo vyšší než u všech ostatních skupin, jak lze vidět u skupiny JS. Výsledky shrnuje Obr. 26 na následující straně.

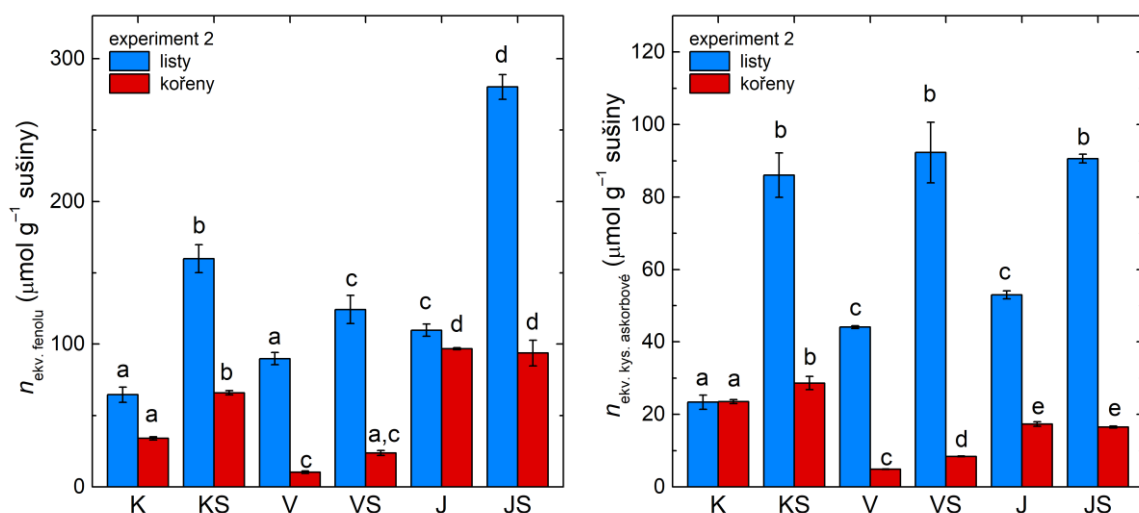


Obr. 26 Obsah proteinů v extraktech z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 2 stanovený metodou dle Bradforda. Množství proteinů je vyjádřeno jako hmotnost proteinů vztažených na gram sušiny rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.3.3 Obsahu fenolických látek a antioxidační kapacita v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita byly stanoveny v extraktech z listů a kořenů. V listech množství fenolických látek vystavením suchu vzrůstalo v případě všech skupin. Nejvyšší množství fenolických látek bylo zjištěno u skupiny ošetřené kopřivovou jichou vystavené suchu (JS), kde bylo jejich množství nejvyšší ze všech skupin. V kořenech se opakovaly trendy pozorované v listech, avšak množství fenolických látek ve skupině JS bylo srovnatelné se skupinou J.

Zatímco antioxidační kapacita stanovená v listech vykazovala srovnatelné hodnoty u všech skupin bez sucha. U skupin vystavených suchu byl pozorován nárůst antioxidační kapacity v případě rostlin ošetřených biostimulanty (VS, JS) oproti kontrolním rostlinám (KS). Oproti tomu v kořenech byla největší antioxidační kapacita pozorována u obou kontrolních skupin. Zde byl také patrný její nárůst se suchem (KS). V případě skupin rostlin ošetřených jichou nebyla výraznější změna se suchem pozorována. Vedle toho v případě skupin ošetřených výluhem z vermikompostu, u nichž byla antioxidační kapacita nejnižší, však ke zvýšení antioxidační kapacity vlivem sucha došlo. Obsah fenolických látek a antioxidační kapacitu shrnuje Obr. 27 na následující straně.

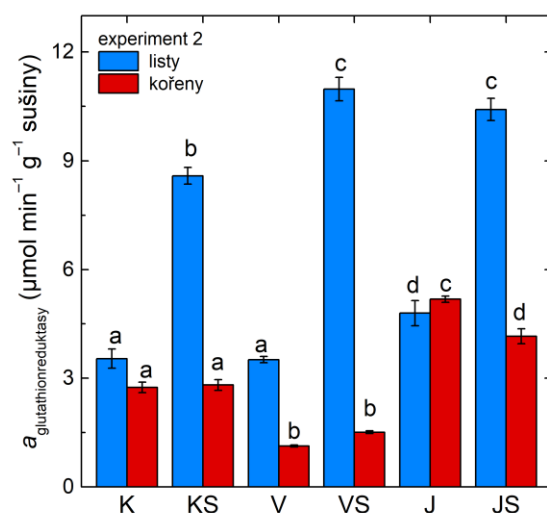


Obr. 27 Vlevo: Obsah fenolických látek v extraktech z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 2 stanovený metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Množství fenolických látek je vyjádřeno jako látkové množství ekv. fenolu na gram sušiny rostlinného materiálu. **Vpravo:** Antioxidační kapacita extraktů z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu stanovená pomocí metody FRAP. Antioxidační kapacita byla vyjádřena jako µmol ekv. kyseliny askorbové na gram sušiny rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.3.4 Aktivita vybraných enzymů v rostlinách kukuřice vystavených suchu

4.3.4.1 Aktivita glutathionreduktasy v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Aktivita glutathionreduktasy byla stanovena v extraktech z kořenů a listů. Její aktivita v listech byla zvýšená ve skupinách ošetřených biostimulanty zároveň stresovaných suchem (JS a VS). V případě skupiny ošetřené jíchou bez stresu (J) byl také patrný nárůst oproti ostatním nestresovaným skupinám. Také v kořenech došlo k nárůstu aktivity glutathionreduktasy u skupin ošetřených kopřivovou jíchou. Oproti tomu skupiny ošetřené výluhem z vermikompostu vykazovaly podobně jako u předchozích měření v kořenech pokles hodnot ve srovnání se všemi ostatními skupinami. Výsledky shrnuje Obr. 28 na následující straně.

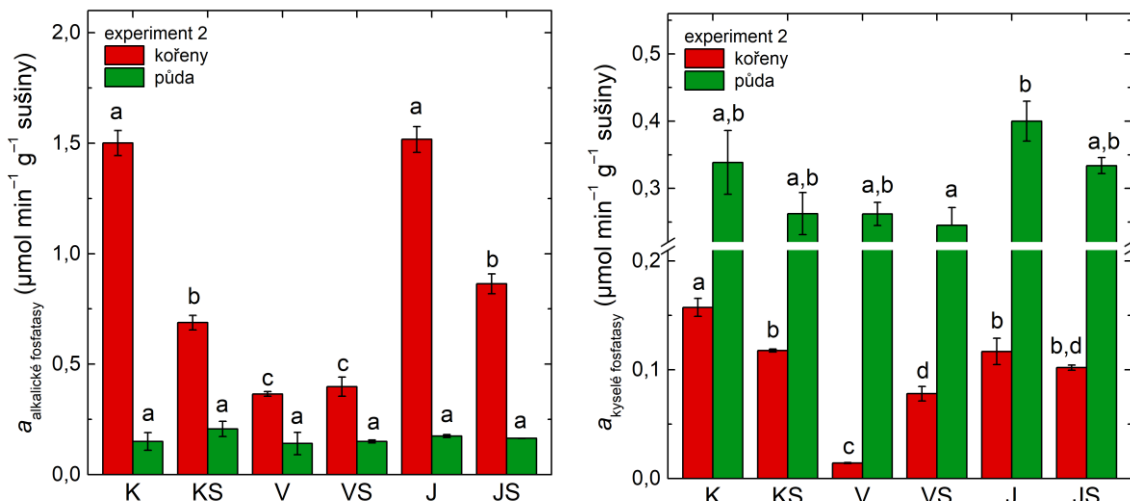


Obr. 28 Aktivita glutathionreduktasy detekovaná v extraktech z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 2. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství NADPH přeměněného za minutu jedním gramem sušiny rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.3.4.2 Aktivita fosfatů v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Aktivita alkalických a kyselých fosfatů byla stanovena v kořenech a půdě. V případě alkalických fosfatů nedošlo v kořenech kontrolních skupin a skupin ošetřených jíchou k žádné výraznější změně. Naopak výrazné snížení aktivity bylo opět pozorováno ve skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu. Ačkoliv v půdě nebyla žádná statisticky významná změna aktivity alkalických fosfatů patrná, je nutné podotknout, že výsledné hodnoty naměřené v půdě byly v porovnání s aktivitou alkalických fosfatů stanovenou v kořenech výrazně nižší.

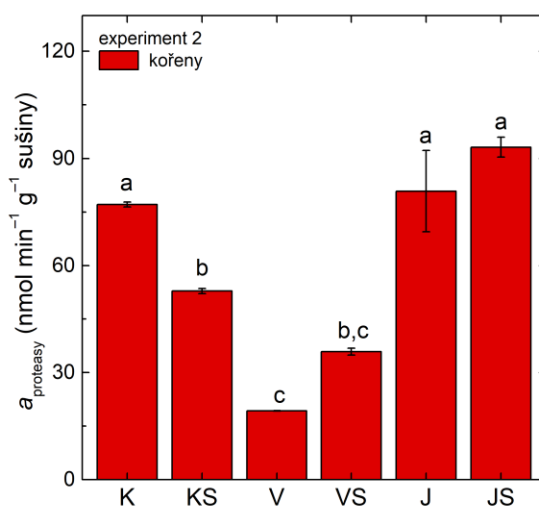
Nejvyšší naměřená hodnota aktivity kyselých fosfatů v kořenech byla zjištěna v kontrolní skupině bez sucha (K). Vystavením suchu (KS), tedy došlo v případě kontrolní skupiny k poklesu aktivity. Ve skupinách ošetřených jíchou se vystavením suchu aktivita kyselých fosfatů zvláště nezměnila a byla srovnatelná s hodnotami aktivity naměřenými ve skupině KS. Velmi nízká aktivita kyselých fosfatů byla naopak pozorována u skupiny ošetřené výluhem z vermikompostu bez sucha (V), avšak v případě skupiny se suchem (VS) byl nárůst aktivity také pozorován. Aktivity kyselých fosfatů v půdě nevykazovaly v rámci skupin žádné statisticky významné změny, ačkoliv určité zvýšení by mohlo být patrné v případě skupiny J. Výsledná aktivita kyselých fosfatů v půdě byla výrazně vyšší v půdě ve srovnání s kořeny. Výsledky stanovení kyselých a alkalických fosfatů shrnuje Obr. 29 na následující straně.



Obr. 29 Aktivita alkalických (vlevo) a kyselých fosfat (vpravo) detekovaná v reakční směsi obsahující extrakt z kořenů nebo vzorek půdy. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství PNPP přeměněného za minutu jedním gramem sušiny kořenů nebo půdy. Toto stanovení bylo provedeno v rámci experimentu 2. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.3.5 Aktivita proteas v rostlinách kukuřice vystavených suchu

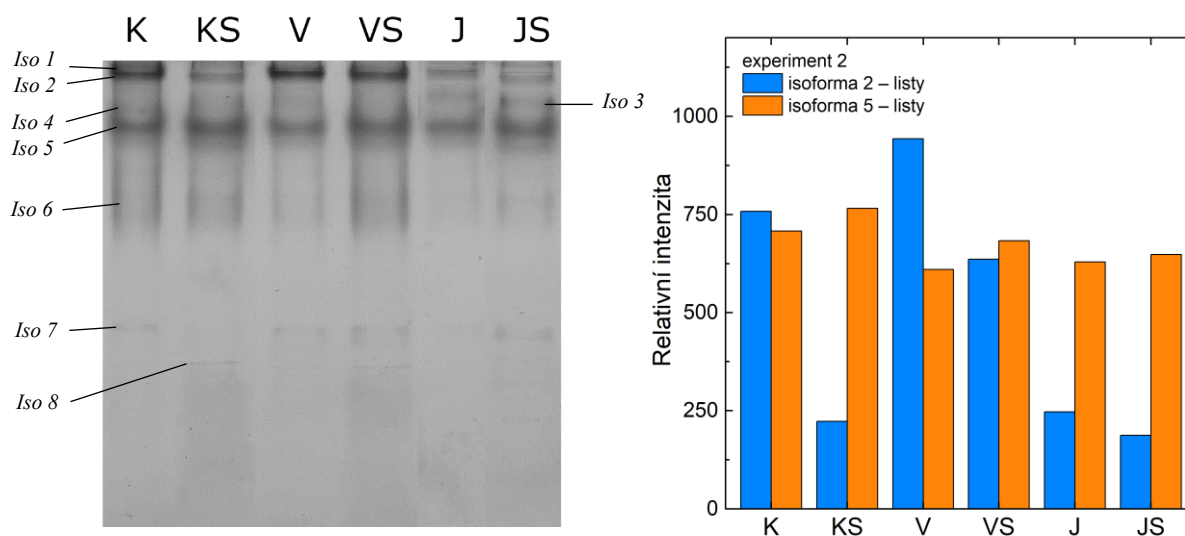
Aktivita proteas byla stanovena v extraktech z kořenů. Naměřená aktivita v kořenech byla srovnatelná v případě kontrolní skupiny bez sucha (K) a obou skupin ošetřených kopřivovou jíchou. Aktivita těchto skupin však byla zvýšená oproti kontrole vystavené suchu (KS). Naopak ve skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu bylo možné pozorovat nejnižší aktivitu proteas ze všech skupin. Vyšší aktivita byla zjištěna po vystavení suchu (VS). Výsledky shrnuje následující Obr. 30.



Obr. 30 Aktivita proteas detekovaná v extraktech kořenů rostlin kukuřice experimentu 2. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství kaseinu přeměněného za minutu jedním gramem sušiny kořenů. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.3.5.1 Aktivita peroxidás v rostlinách kukuřice vystavených suchu

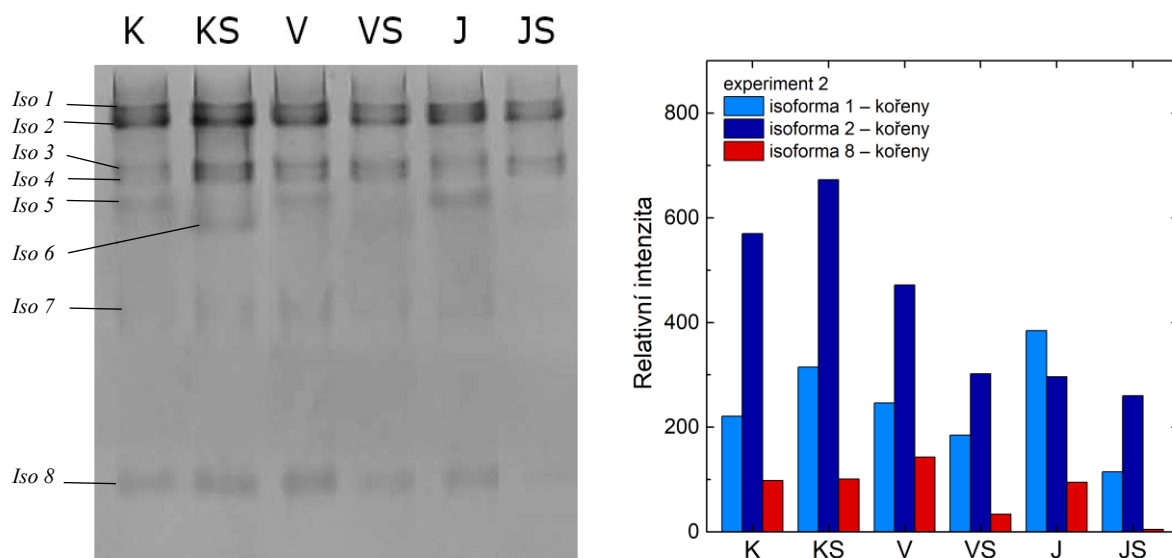
Po nativní elektroforetické separaci bylo identifikováno celkem 8 rozlišitelných isoform peroxidás v listech kukuřice. Nejvyšší aktivita byla patrná u isoform 2 a 5. Zatímco aktivita isoformy 5 se se suchem ve všech skupinách mírně zvyšovala, aktivita isoformy 2 vlivem sucha klesala. V případě skupin ošetřených jíchou se suchem nedocházelo k tak výraznému poklesu. Všeobecně nejvyšší aktivita většiny isoform byla patrná ve skupině VS. Zvláštností skupin ošetřených jíchou byla výrazná aktivita isoformy 3. Ve skupinách KS a VS byla na rozdíl od ostatních skupin přítomná isoforma 8. Výsledky shrnuje následující Obr. 31.



Obr. 31 Vlevo: Aktivita peroxidás extrahovaných z listů rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami.

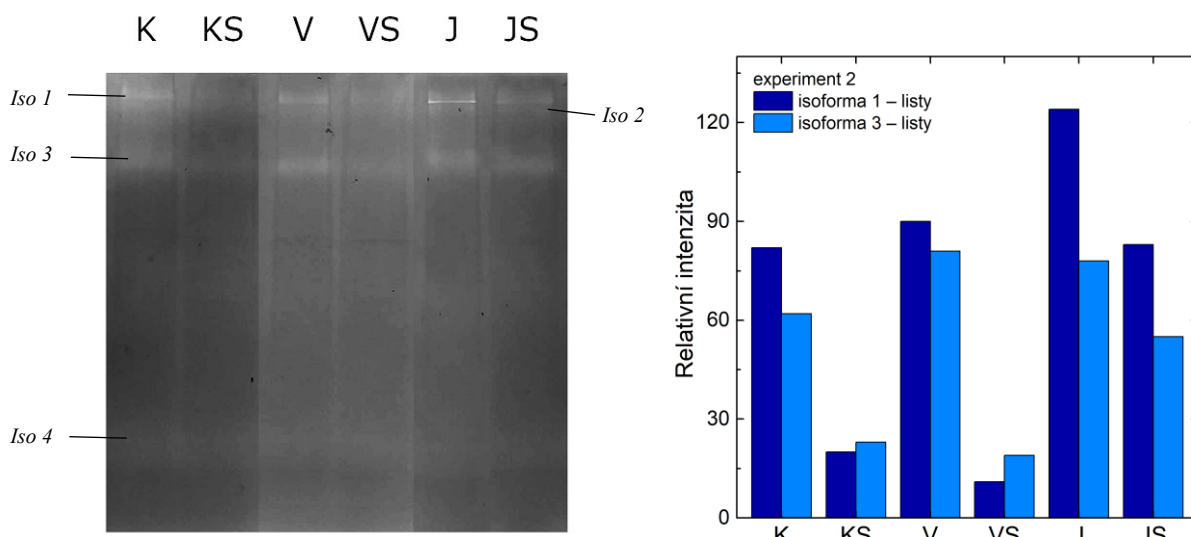
Vpravo: Grafické znázornění aktivity peroxidás – isoformy 3 a 6. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

Vedle toho v kořenech bylo identifikováno celkem 8 rozlišitelných isoform peroxidás. U nejvíce aktivních isoform 1 a 2 lze pozorovat nárůst aktivity vlivem sucha v kontrolní skupině. Ve skupinách ošetřených biostimulanty lze pozorovat opačný trend, tedy pokles aktivity se suchem. Tyto isoformy byly nejvýraznější u skupiny KS, kde měly aktivitu zvýšenou i další isoformy – 3, 4 a 6. Všeobecně nejméně aktivní byla naopak skupina JS. Zvláštností skupin ošetřených biostimulanty bez sucha byl nárůst aktivity isoformy 8 v případě skupiny V a nárůst aktivity isoformy 5 ve skupině J. Výsledky shrnuje Obr. 32 na následující straně.



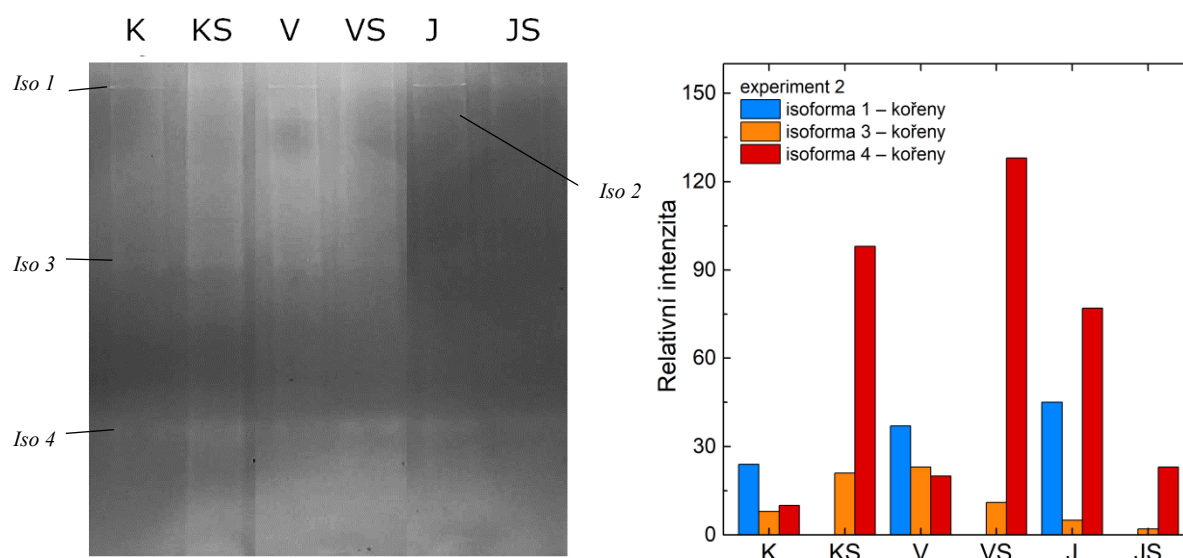
Obr. 32 Vlevo: Aktivita peroxidasy extrahovaných z kořenů rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami.
Vpravo: Grafické znázornění aktivity peroxidasy – isoformy 1, 2 a 8. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

Po nativní elektroforetické separaci byly identifikovány celkem 4 rozlišitelné isoformy askorbátperoxidasy v listech kukuřice. V případě isoformy 4 nebyl pozorován významný rozdíl napříč skupinami, isoformy 1 a 3 vykazují pokles aktivity se suchem u všech skupin. Ten je nejvýraznější ve skupinách ošetřených jíchou. Ve skupině JS je také lépe patrná isoforma 2. Výsledky shrnuje následující Obr. 33.



Obr. 33 Vlevo: Aktivita askorbátperoxidasy extrahované z listů rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami.
Vpravo: Grafické znázornění aktivity askorbátperoxidasy – isoformy 1 a 3. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

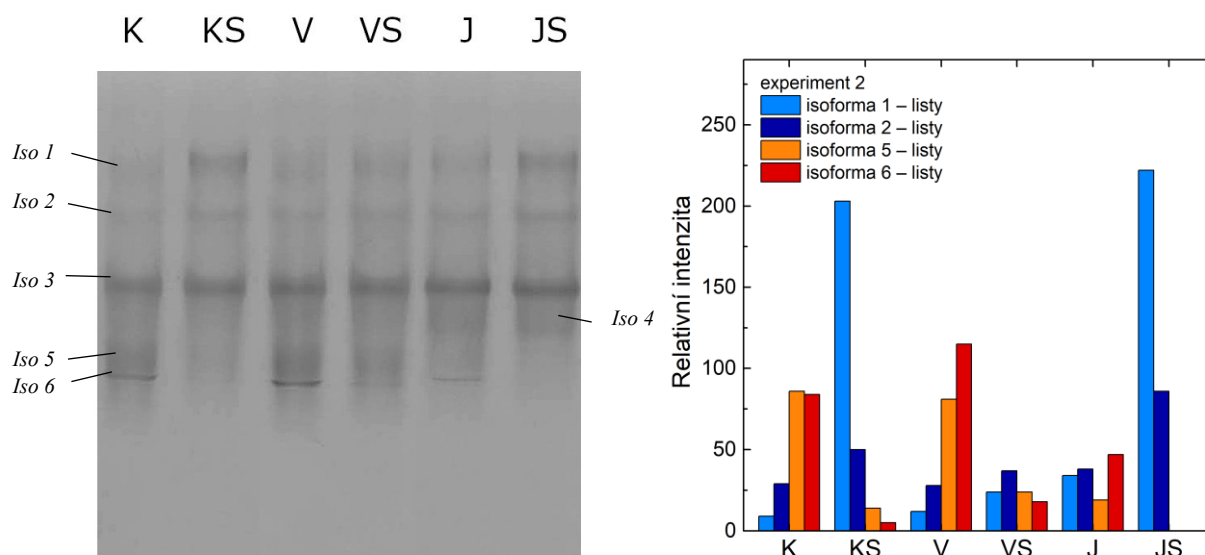
Vedle toho v kořenech byly identifikovány celkem 4 rozlišitelné isoformy askorbátperoxidasy. Isoforma 1 je dobře patrná ve všech rostlinách nevystavených suchu. Aktivita této isoformy je zvýšená ve skupinách ošetřených biostimulanty oproti skupině kontrolní. Isoforma 2 je patrná pouze ve skupinách ošetřených biostimulanty bez sucha (J a V) a více aktivní byla ve skupině V. Nejvyšší aktivitu měla isoforma 4, ta v kontrolních skupinách a skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu stresovaných suchem vzrůstala, zatímco ve skupinách ošetřených jíchou se suchem naopak poklesla. Nejvýraznější byla ve skupině VS. Výsledky shrnuje následující Obr. 34.



Obr. 34 Vlevo: Aktivita askorbátperoxidasy extrahované z kořenů rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami. **Vpravo:** Grafické znázornění aktivity askorbátperoxidasy – isoformy 1, 3 a 4. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.3.5.2 Aktivita NADPH-oxidasy v rostlinách kukuřice vystavených suchu

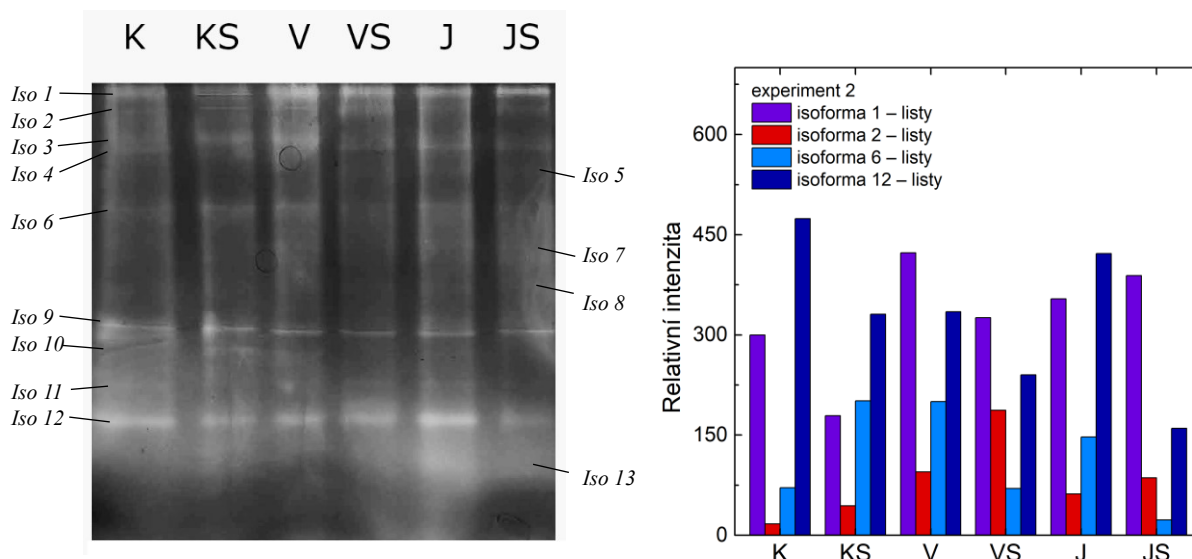
Po nativní elektroforetické separaci bylo identifikováno celkem 6 rozlišitelných isoform NADPH-oxidasy v listech kukuřice. Aktivita isoform 1 a 2 vlivem sucha vzrostla, přičemž skupiny ošetřené výluhem z vermikompostu vykazovaly oproti ostatním skupinám sníženou aktivitu. Vedle toho v případě isoformy 3 není pozorovatelná výrazná změna aktivity. V případě isoform 5 a 6 došlo vystavením suchu naopak k mírnému snížení aktivity u většiny skupin. Tyto isoformy nebyly patrné ve skupině JS. Zvýšená aktivita isoformy 6 byla vidět v rostlinách bez stresu a nejvíce pak ve skupině V. V gelu lze pozorovat také isoformu 4, ta je patrná ve skupinách ošetřených biostimulanty, zejména v rostlinách ošetřených jíchou. Výsledky shrnuje následující Obr. 35 na následující straně.



Obr. 35 Vlevo: Aktivita NADPH-oxidasy extrahované z listů rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami. **Vpravo:** Grafické znázornění aktivity NADPH oxidasy – isoformy 1, 2, 5 a 6. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.3.5.3 Aktivita glutathion-S-transferasy v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Po nativní elektroforetické separaci bylo identifikováno celkem 13 rozlišitelných isoform glutathion-S-transferasy v listech kukuřice. V případě kontrolních skupin nedošlo vystavením suchu u většiny isoform k výrazné změně aktivity. K mírnému zvýšení došlo u isoform 1–3 a 12 a naopak k poklesu u isoformy 12. V případě skupin ošetřených biostimulanty došlo vystavením suchu k patrnějšímu poklesu aktivity u většiny isoform. Nejvyšší aktivita je pozorovatelná u isoform 1–3 skupiny V a také u isoformy 12 a 13 skupiny J. Výsledky shrnuje Obr. 36 na následující straně.

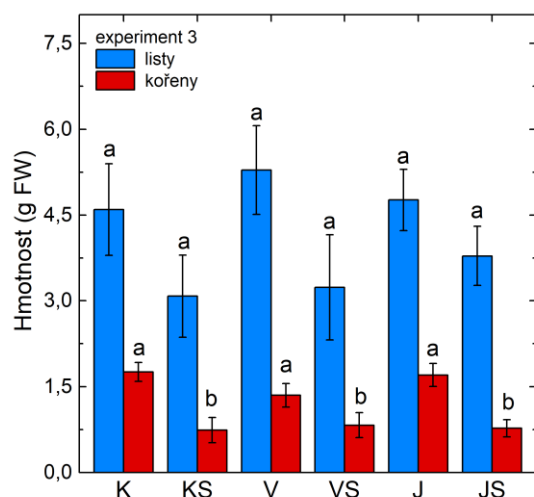


Obr. 36 Vlevo: Aktivita glutathion-S-transferasy extrahované z listů rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami. **Vpravo:** Grafické znázornění aktivity glutathion-S-transferasy – isoformy 1, 2, 6 a 12. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.4 Vliv biostimulantů na rostliny kukuřice vystavených suchu v experimentu 3

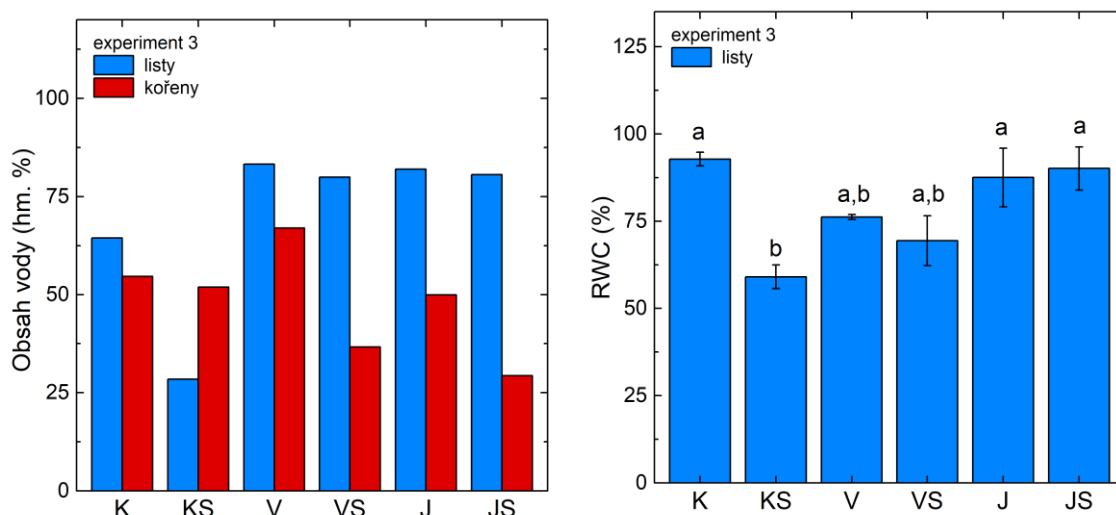
4.4.1 Charakterizace rostlin kukuřice vystavených suchu

V rámci experimentu 3 byl testován efekt ošetření kopřivovou jíchou a výluhem z vermikompostu o koncentraci 20 g/l na rostliny kukuřice vystavené stresu suchem po dobu 4 dnů oproti nestresovaným skupinám a kontrole. Na rozdíl od experimentu 2 byl pro pěstování rostlin použit substrát s nižším obsahem živin a byla zkrácena doba sucha. Ve skupinách sledovaných rostlin kukuřice nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v hmotnostech nadzemních částí rostlin. Avšak hmotnost kořenů všech skupin stresovaných rostlin se suchem poklesla, jak ilustruje Obr. 38 na následující straně.



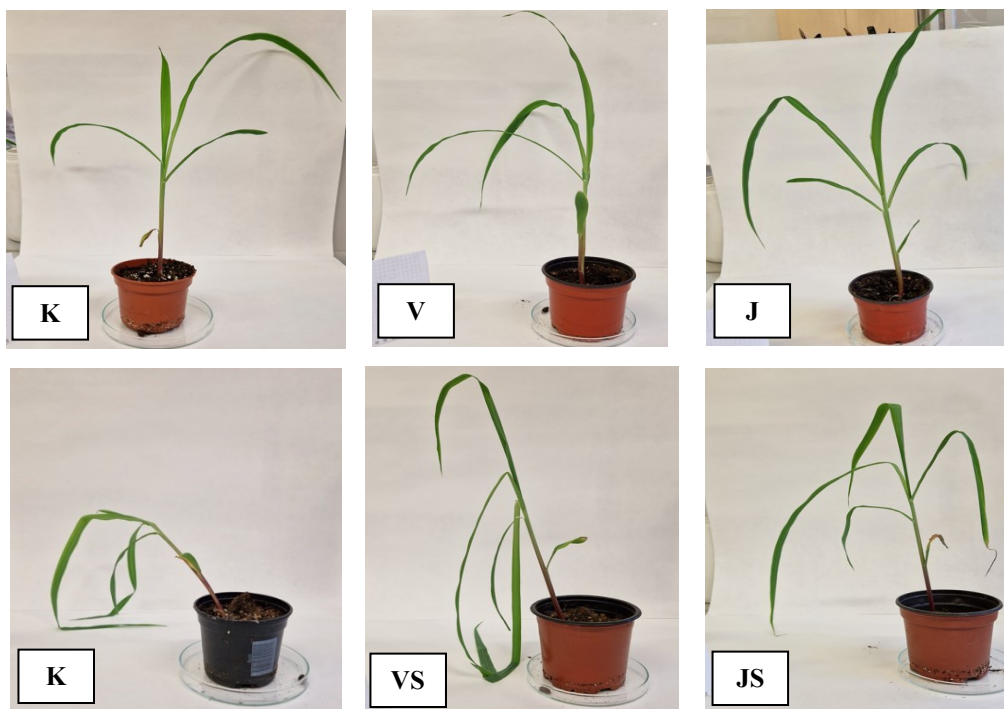
Obr. 38 Růstové parametry rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 3. Hmotnost rostlinných částí je vztažena na čerstvou hmotnost (FW). **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

Dále byl v rostlinných částech stanoven obsah vody. Obsah vody v listech stanovený pomocí lyofilizace byl stejný u všech skupin ošetřené biostimulanty, nezávisle na vystavení suchu. Oproti tomu v kontrolních skupinách byl se suchem pozorován výrazný pokles. Vedle toho v kořenech došlo ve stresovaných skupinách ošetřené biostimulanty k jeho snížení. Výrazně se nezměnil v rostlinách kontrolních (K, KS). Obsah vody v listech byl také stanovován pomocí metody RWC, kde byl ve srovnání se zalévanými rostlinami patrný pokles vody v listech rostlin stresovaných (KS) oproti zalévaným (K). Ošetření biostimulanty vedlo k zadržení vody v listech při vystavením suchu, kdy vyšší obsah vody obsahovaly rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (JS). Výsledky zobrazuje následující Obr. 37.



Obr. 37 Vlevo: Obsah vody v listech a kořenech rostlin kukuřice pěstovaných v rámci experimentu 2 zjištěný lyofilizací. **Vpravo:** Relativní obsah vody v listech zjištěný pomocí metody RWC. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

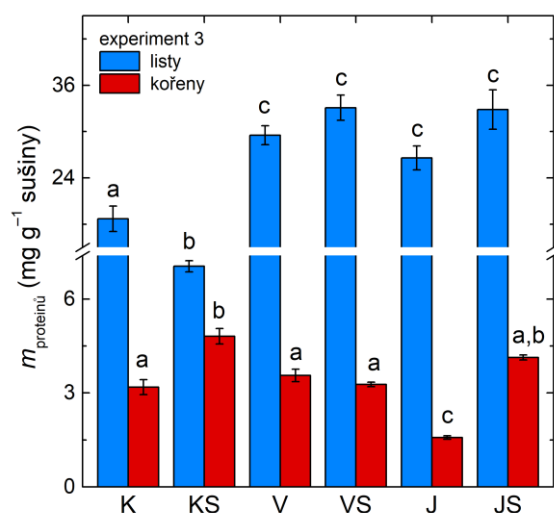
Vzhled rostlin ošetřených biostimulanty se od kontrolních ani tentokrát výrazně nelišil. Ale v případě skupin vystavených suchu došlo u rostlin ze skupiny KS k výraznějšímu poklesu turgoru v nadzemních částech rostlin oproti ošetřeným skupinám. Výsledky shrnuje následující Obr. 39.



Obr. 39 Rostliny kukuřice pěstované v rámci experimentu 3 po 21 dnech od vysazení. Rostliny vystavené suchu neměly po dobu 4 dnů přístup k závlaze. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.4.2 Obsah proteinů v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Obsah proteinů byl stanoven v extraktech z listů a kořenů. Množství proteinů stanovené v listech bylo nejvyšší ve skupinách ošetřených biostimulanty. Toto množství bylo srovnatelné jak ve skupinách vystavených suchu, tak i skupin bez sucha. Nižší množství proteinů bylo stanoveno v případě kontrolních skupin, kdy byl pozorován pokles proteinů vlivem sucha (KS). Na rozdíl od výsledků zjištěných v listech byl obsah proteinů stanovený v kořenech ve skupinách ošetřených biostimulanty stejný, nebo nižší než obsah proteinů v kontrolních skupinách. Rovněž u skupiny KS došlo oproti skupině K k nárůstu obsahu proteinů. Nejnižší množství proteinů v kořenech bylo oproti tomu pozorováno u skupiny J, ačkoliv vystavením suchu (JS) vzrostlo množství proteinů na hodnotu srovnatelnou s KS. Ve skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu se suchem k významným změnám nedošlo. Výsledky shrnuje Obr. 40 na následující straně.

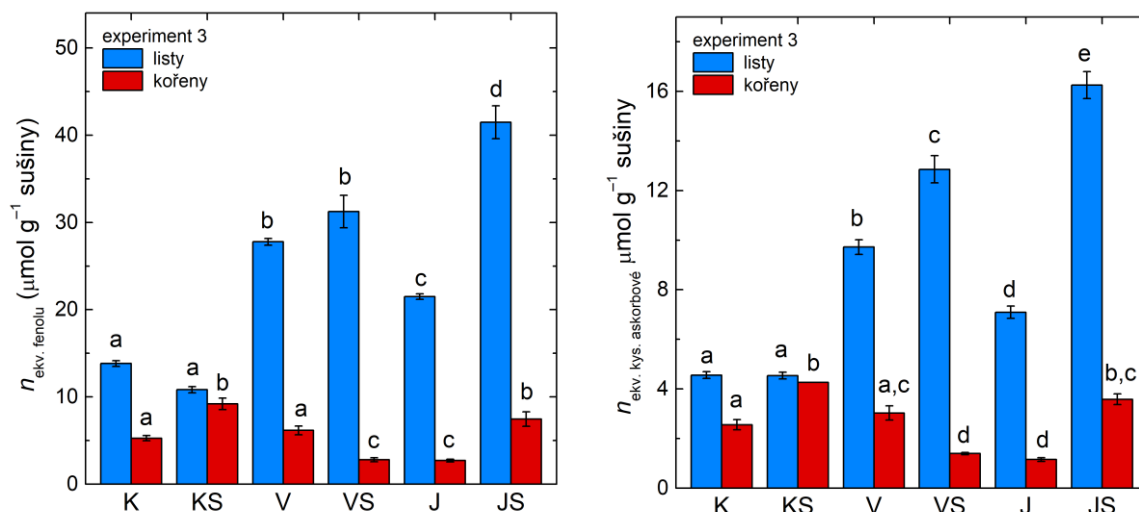


Obr. 40 Obsah proteinů v extraktech z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 3 stanovený metodou dle Bradforda. Množství proteinů je vyjádřeno jako hmotnost proteinů vztažených na gram sušiny rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jichou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.4.3 Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Obsah fenolických látek a antioxidační kapacita byly stanoveny v extraktech z listů a kořenů. Množství fenolických látek v listech bylo v porovnání s kontrolou výrazně vyšší u všech skupin ošetřených biostimulanty vystavených suchu i bez sucha. Nejvyšší obsah fenolických látek byl stanoven ve skupině JS, u které byl oproti skupině J pozorován dobře patrný nárůst. Vedle toho v kořenech byl naměřený obsah fenolických látek u skupin ošetřených biostimulanty naopak všeobecně nižší oproti kontrolním skupinám. Výjimkou byla skupina JS, která dosahovala srovnatelných hodnot jako skupina KS, kde byl zjištěn obsah fenolických látek nejvyšší.

V případě stanovených hodnot antioxidační kapacity byly v listech i kořenech pozorovány trendy podobné stanovení obsahu fenolických látek. Zatímco v listech byla zvýšená antioxidační kapacita pozorována ve všech skupinách ošetřených biostimulanty, v případě kořenů byl s výjimkou skupiny JS naopak pozorován určitý pokles oproti kontrolním skupinám. Antioxidační kapacita zjištěná v listech byla také vyšší v případě skupin ošetřených biostimulanty vystaveným suchu oproti analogickým skupinám bez sucha. Obsah fenolických látek a antioxidační kapacitu shrnuje Obr. 41 na následující straně.

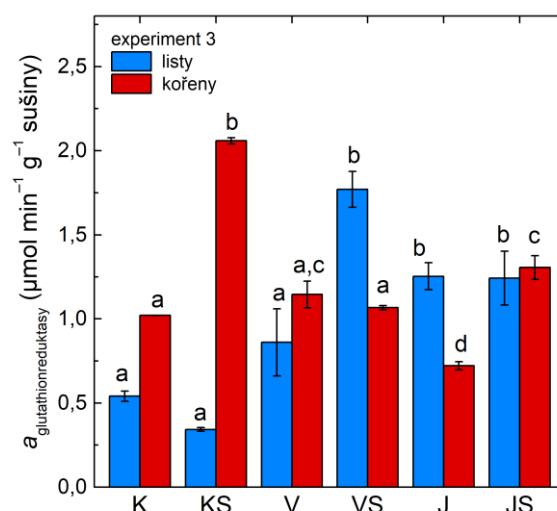


Obr. 41 Vlevo: Obsah fenolických látek v extraktech z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 3 stanovený metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Množství fenolických látek je vyjádřeno jako látkové množství ekv. fenolu na gram sušiny rostlinného materiálu. **Vpravo:** Antioxidační kapacita extraktů z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 3 stanovená pomocí metody FRAP. Antioxidační kapacita byla vyjádřena jako μmol ekv. kyseliny askorbové na gram sušiny rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.4.4 Aktivita vybraných enzymů v rostlinách kukuřice vystavených suchu

4.4.4.1 Aktivita glutathionreduktasy v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Aktivita glutathionreduktasy byla stanovena v extraktech z kořenů a listů. Naměřené hodnoty aktivity v listech byly oproti kontrolním skupinám zvýšené v případě obou ošetřených skupin biostimulanty. Oproti tomu v kořenech bylo možné pozorovat významný nárůst aktivity ve skupině KS. V případě skupin ošetřených výluhem z vermikompostu nedošlo oproti kontrolní skupině (K) k významnější změně. Vedle toho ve skupinách ošetřených kopřivovou jíchou byla ve skupině J pozorována nejnižší naměřená aktivita v kořenech. Avšak aktivita stanovená ve skupině vystavené suchu (JS) byla oproti skupině K zvýšená. Trendy pozorované v rámci tohoto stanovení se do jisté míry podobají trendům, které vykazují výsledky stanovení obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity. Výsledky shrnuje následující Obr. 42 na následující straně.

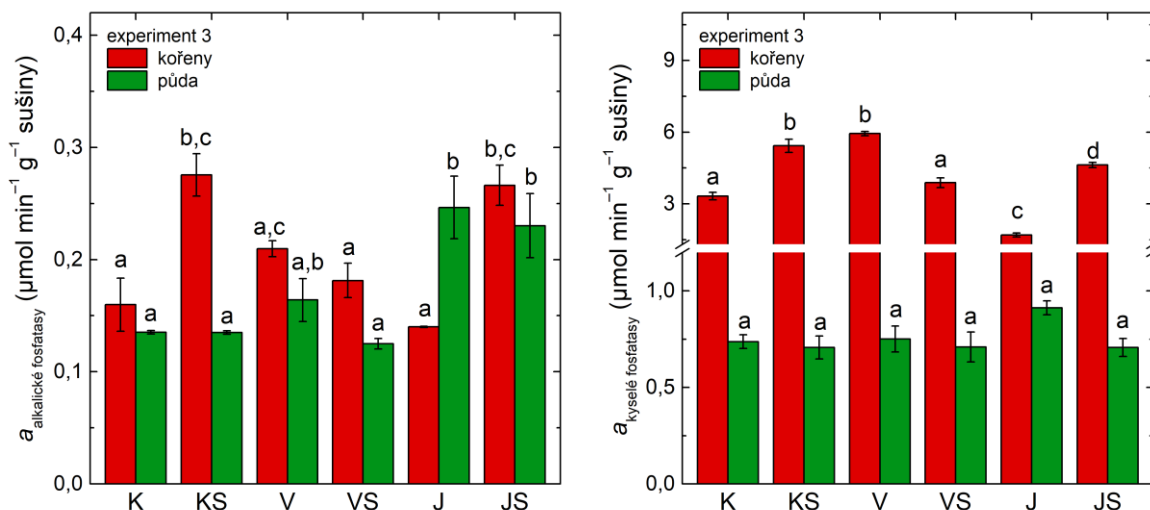


Obr. 42 Aktivita glutathionreduktasy detekovaná v extraktech z listů a kořenů rostlin kukuřice experimentu 3. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství NADPH přeměněného za minutu jedním gramem sušiny rostlinného materiálu. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.4.4.2 Aktivita fosfatas v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Aktivita alkalických a kyselých fosfatas byla stanovena v kořenech a půdě. Hodnoty aktivity alkalických fosfatas naměřené v kořenech byly srovnatelné ve všech skupinách bez stresu a ve skupině VS. Ve skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu tedy nebyl pozorován nárůst aktivity se suchem, který je patrný v kontrolních skupinách a skupinách ošetřených jíchou. Oproti tomu aktivita alkalických fosfatas stanovená v půdě, byla zvýšená u obou skupin ošetřených kopřivovou jíchou, zatímco aktivita ostatních skupin byla srovnatelná.

V případě stanovení aktivity kyselých fosfatas v kořenech bylo možné pozorovat nárůst hodnot spojený se stresem ve skupinách ošetřených kopřivovou jíchou a ve skupinách kontrolních. Aktivita naměřená ve skupinách J i JS byla v obou případech nižší než u jejich příslušných kontrol. Naopak ve skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu byl pozorován pokles aktivity se suchem. Zjištěné hodnoty aktivity ve skupině V byly srovnatelné s hodnotami naměřenými ve skupině KS a hodnoty zjištěné ve skupině VS odpovídaly hodnotám skupiny K. Oproti tomu aktivita kyselých fosfatas stanovená v půdě nevykazovala žádné statisticky významné změny. Za zmínku také stojí fakt, že detekovaná aktivita kyselých fosfatas v kořenech byla řádově vyšší oproti hodnotám zjištěným v půdě. Výsledky stanovení aktivity kyselých i alkalických fosfatas shrnuje Obr. 43 na následující straně.



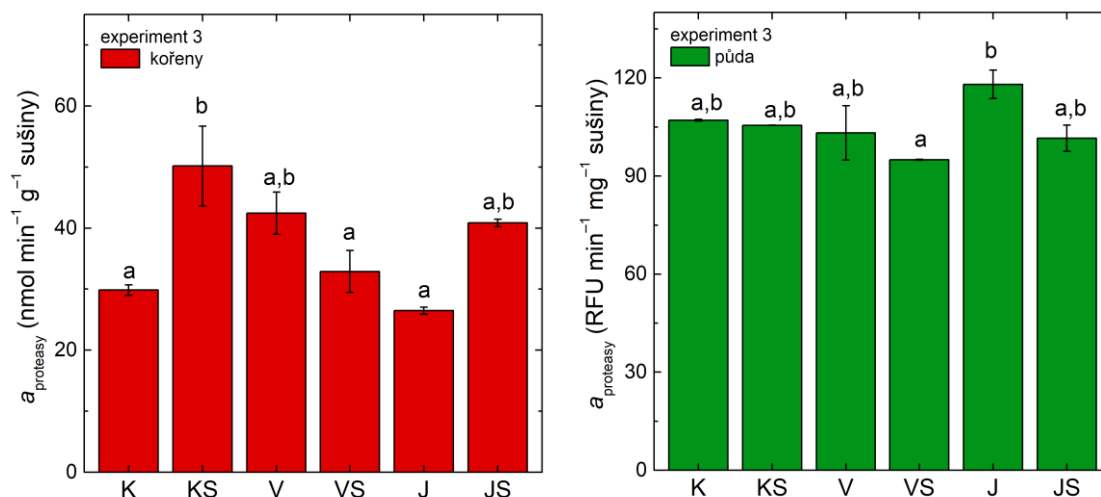
Obr. 43 Aktivita alkalických (vlevo) a kyselých fosfatasy (vpravo) detekovaná v reakční směsi obsahující extrakt z kořenů nebo vzorek půdy. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství PNPP přeměněného za minutu jedním gramem sušiny kořenů nebo půdy. Toto stanovení bylo provedeno v rámci experimentu 3.

Zkratky: kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.4.4.3 Aktivita proteas v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Proteolytická aktivita byla stanovena v extraktech z kořenů pomocí kaseinu. Stanovena byla také proteolytická aktivita v reakční směsi obsahující půdu pomocí metody s fluorescenčně značeným kaseinem. Tato metoda byla použita vzhledem k nízké aktivitě proteas v půdě.

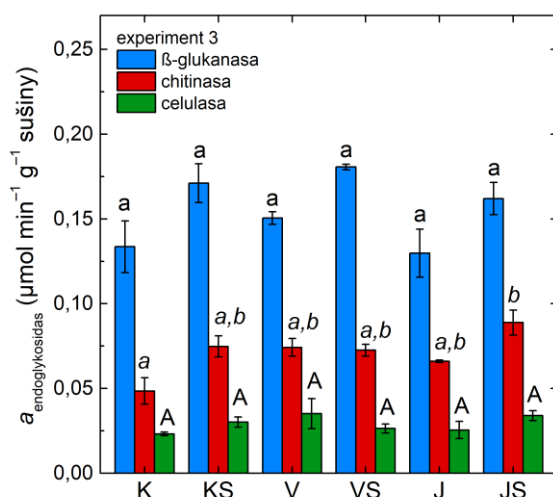
Aktivita proteas v kořenech nevykazovala ve většině skupin výraznější statisticky významné změny. I zde byl však pozorovatelný trend nárůstu proteolytické aktivity ve skupině KS oproti K. Tento trend bylo možné pozorovat i u dalších stanovení v kořenech rostlin experimentu 3. Z hodnot proteolytické aktivity stanovované v půdě také nevyplývaly významné rozdíly v rámci skupin. Určitý rozdíl byl zjištěn pouze při porovnání skupin VS a J. Výsledky obou stanovení shrnuje Obr. 44 na následující straně.



Obr. 44 Vlevo: Aktivita proteas detekovaná v extraktech kořenů rostlin kukuřice experimentu 3. Enzymová aktivita je vyjádřena jako látkové množství kaseinu přeměněného za minutu jedním gramem sušiny kořenů. **Vpravo:** Aktivita proteas detekovaná v reakční směsi obsahující vzorek půdy. Toto stanovení bylo provedeno v půdě rostlin kukuřice experimentu 3. Enzymová aktivita je vyjádřena v relativních jednotkách fluorescence (RFU) vztažených na gram sušiny půdy. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

4.4.4.4 Aktivita β -1,3-glukanasy , celulasy a chitinasy v rostlinách kukuřice vystavených suchu

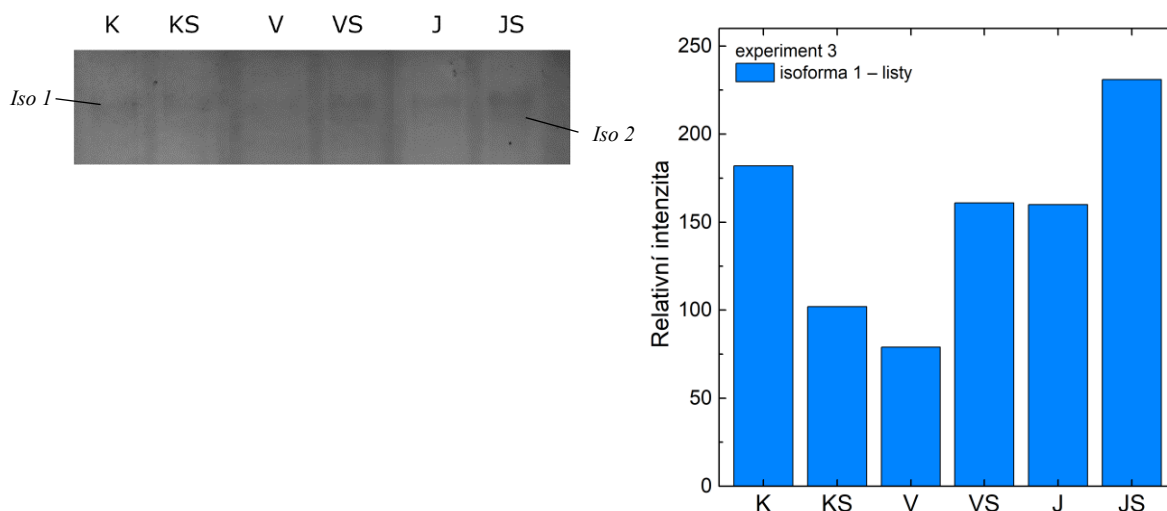
Aktivita endoglykosidas – β -1,3-glukanasy, chitinasy a celulasy, byla stanovena v extraktech z půdy. Stanovené hodnoty aktivity β -1,3-glukanasy nevykazovaly žádné statisticky významné změny. Výsledky by však mohly naznačovat určitý pokles aktivity se suchem, neodlišný v rámci skupin. V případě stanovení aktivity chitinasy se významnější změna její aktivity v půdě projevila pouze při porovnání kontrolní skupiny (K) a skupiny ošetřené kopřivovou jíchou vystavené suchu (JS). Ačkoliv rozdíl mezi skupinami KS a JS pozorován nebyl. Oproti těmto zjištěním nevykazovala aktivita celulasy v půdě žádné pozorovatelné ani statisticky významné změny. Výsledky shrnuje Obr. 45 na následující straně.



Obr. 45 Aktivita endoglykosidas – β -1,3-glukanasy, chitinasy a celulasy detekovaná v extraktech půdy rostlin kukuřice experimentu 3. Enzymová aktivita je vyjádřena jako redukční ekv. látkového množství glukosy vzniklý za minutu vztažený na gram sušiny půdy. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

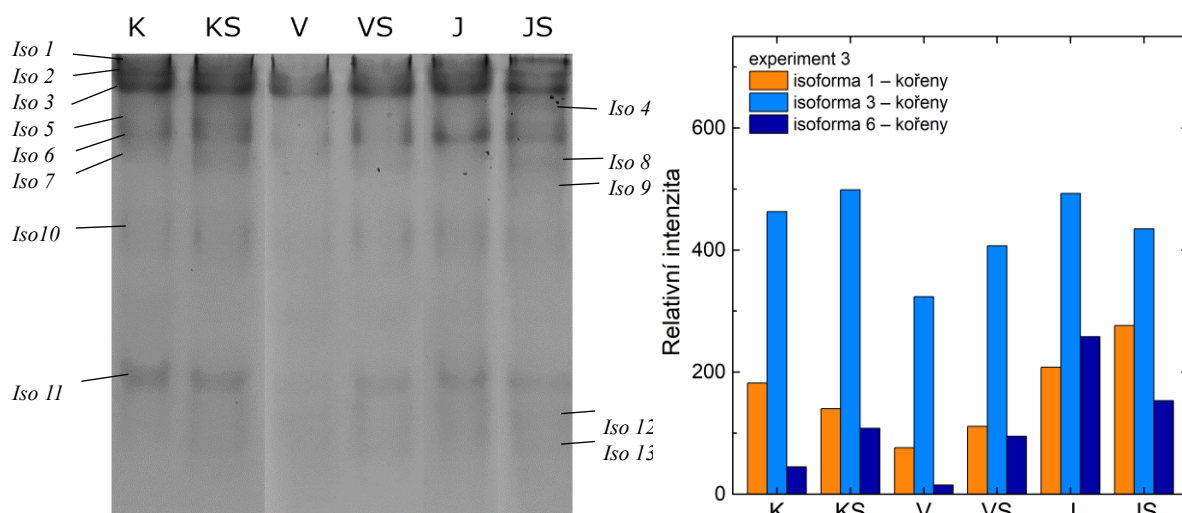
4.4.4.5 Aktivita peroxidas v rostlinách kukuřice vystavených suchu

Po nativní elektroforetické separaci byly identifikovány celkem 2 rozlišitelné isoformy peroxidas v listech kukuřice. Isoforma 1 byla přítomna ve všech skupinách. Zatímco v kontrolních skupinách její aktivita s vystavením suchu vzrůstala, ve skupinách ošetřených biostimulanty klesala. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u skupiny JS nejnižší naopak ve skupině V. Isoforma 2 byla lépe rozlišitelná pouze ve skupinách vystavených suchu. Její aktivita byla výraznější ve skupinách ošetřených biostimulanty a zejména pak ve skupině JS. Výsledky shrnuje následující Obr. 46.



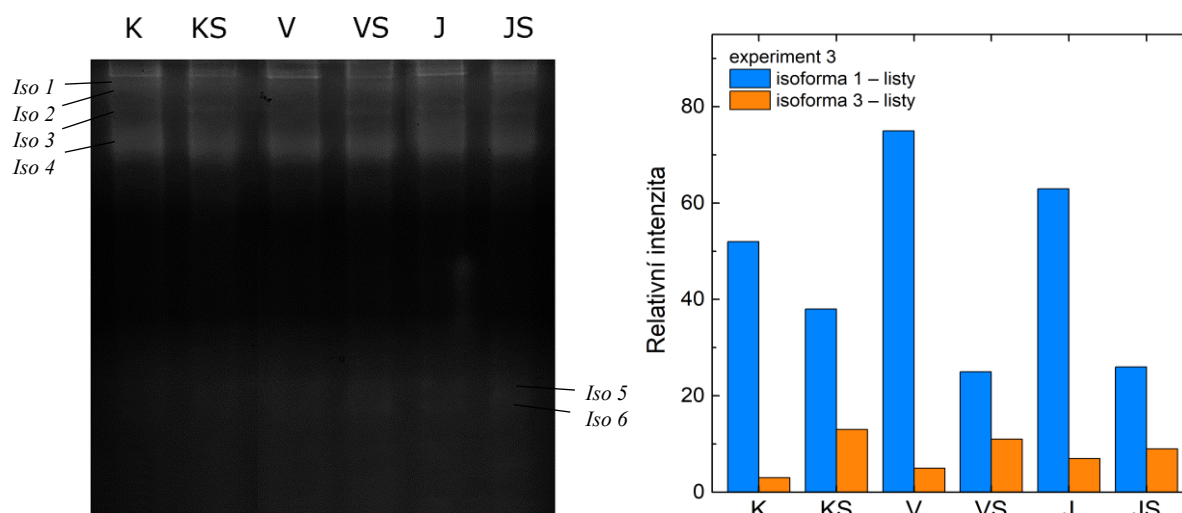
Obr. 46 Vlevo: Aktivita peroxidas v listech rostlin kukuřice experimentu 3. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami. **Vpravo:** Grafické znázornění aktivity peroxidas – isoformy 1. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

Vedle toho v kořenech bylo identifikováno celkem 13 rozlišitelných isoform peroxidas. Nejvyšší aktivita se projevila u isoform 2 a 3, což bylo patrné především u kontrolních skupin a skupin ošetřených jíchou. Všeobecně nejnižší aktivita všech isoform byla pozorována ve skupině V, avšak při vystavení suchu (VS) byl pozorován nárůst v aktivitě srovnatelný s ostatními skupinami se suchem. V kontrolních skupinách a skupinách ošetřených jíchou nebyla vlivem sucha pozorována výrazná změna aktivity, ačkoliv skupiny ošetřené jíchou se aktivitou některých isoform lišily. Například ve skupině J byla pozorována zvýšená aktivita isoformy 6 oproti ostatním skupinám. Ve skupině JS pak byla zvýšená aktivita isoformy 1 a isoformy 4 a 9. Výsledky shrnuje následující Obr. 47.



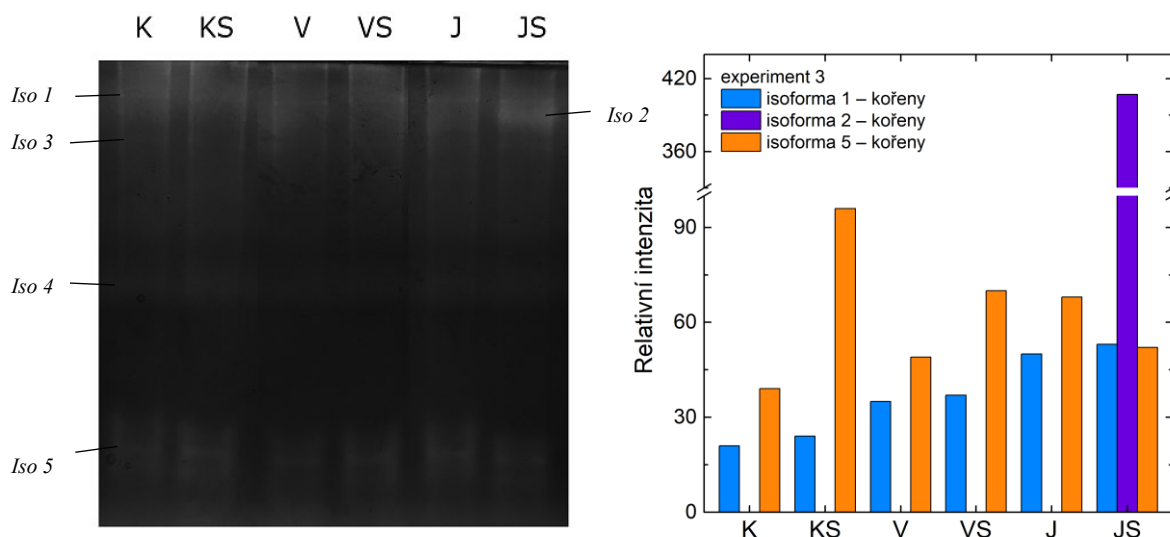
Obr. 47 Vlevo: Aktivita peroxidas v kořenech rostlin kukuřice experimentu 3. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami. **Vpravo:** Grafické znázornění aktivity peroxidas – isoformy 1, 3 a 6. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

V listech kukuřice bylo identifikováno celkem 6 rozlišitelných isoform askorbátperoxidasy. Nejvyšší aktivitu bylo možné pozorovat v případě isoformy 4, jejíž aktivita se v rámci skupin příliš nelišila. Vedle toho isoformy 1 a 3 vykazovaly změnu při vystavení suchu. Aktivita isoformy 1 byla vyšší ve skupinách bez sucha, a to zejména ve skupinách ošetřených biostimulanty. Naopak isoforma 3 byla výraznější ve skupinách vystavených suchu, ačkoliv v případě skupin ošetřených jíchou byla její aktivita srovnatelná i v případě vystavení suchu. Také proužek zobrazující málo aktivní isoformu 2 byl více viditelný v případě skupin ošetřených biostimulanty vystavených suchu (VS, JS). Ve spodní části gelu lze také pozorovat málo aktivní isoformy 5 a 6, u kterých nelze s jistotou určit změnu v rámci skupin. Výraznější však zřejmě byly ve skupinách ošetřených biostimulanty. Výsledky shrnuje Obr. 48 na následující straně.



Obr. 48 Vlevo: Aktivita askorbátperoxidasy v listech rostlin kukuřice experimentu 3. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami. **Vpravo:** Grafické znázornění aktivity askorbátperoxidasy – isoformy 1 a 3. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

Vedle toho v kořenech bylo identifikováno celkem 5 rozlišitelných isoform askorbátperoxidasy. Nevíce aktivní izoformou byla isoforma 2, která je patrná pouze u skupiny JS. Vyšší aktivitu bylo možné pozorovat také u isoformy 5. Zde byl vidět nárůst aktivity ve stresovaných skupinách ošetřených výluhem z vermikompostu, a především ve skupinách kontrolních. Naopak tomu je u skupin ošetřených jíchou. V případě isoformy 1 lze pozorovat mírný nárůst aktivity ve skupinách ošetřených biostimulanty. Výsledky shrnuje následující Obr. 49.



Obr. 49 Vlevo: Aktivita askorbátperoxidasy v kořenech rostlin kukuřice experimentu 3. Aktivita jednotlivých isoform byla detekována po provedení nativní elektroforetické separace v 10% (w/v) polyakrylamidovém gelu. Proužky značící aktivitu jednotlivých isoform jsou vyznačeny šipkami. **Vpravo:** Grafické znázornění aktivity askorbátperoxidasy – isoformy 1, 2 a 5. Hodnoty relativní intenzity byly převzaty z programu GelAnalyzer. **Zkratky:** kontrolní rostliny (K), rostliny ošetřené výluhem z vermikompostu (V), rostliny ošetřené kopřivovou jíchou (J), skupiny vystavené suchu (KS; VS; JS).

5 Diskuze

5.1 Charakterizace biostimulantů

Biostimulanty poskytují rostlinám podporu růstu a/nebo vyšší odolnost vůči abiotickému i biotickému stresu viz Teoretický úvod. V této práci byly charakterizovány dva vybrané biostimulanty přírodního původu – kopřivová jícha a výluh z vermikompostu. I když složení produktů vermikompostace je poměrně dobře zmapováno, o mechanismu účinku se zatím ví málo [72]. Kopřivová jícha je často využívána zahrádkáři pro snadnou dostupnost a jako zdroj dusíku, avšak její charakterizace a mechanismus účinku chybí [53].

Jednou z možností podpory růstu rostlin je přítomnost živin v biostimulantu [11]. Oba biostimulanty obsahovaly proteiny, výluh z vermikompostu byl šestkrát bohatší než kopřivová jícha. Z hlediska velikosti proteinů se jednalo o proteiny s nižší molekulovou hmotností a peptidy, v kopřivové jíše se však vyskytovaly i proteiny s vyšší molekulovou hmotností (Obr. 6 na straně 48; Obr. 7 na straně 49; Obr. 8 na straně 49). Lze se tedy domnívat, že proteiny mohou sloužit jako zdroj energie pro půdní mikroorganismy. Tyto proteiny mohou být dále degradovány půdními proteasami, které jsou sekretovány kořeny rostlin i půdními mikroorganismy [39,93]. Oba biostimulanty obsahovaly i detekovatelné vlastní proteasy (Obr. 12 na straně 52), takže lze předpokládat i další degradaci proteinů na menší fragmenty. Navíc byly některé peptidy identifikovány jako stimulatory růstu; je tedy možné, že některé z peptidů ve zkoumaných biostimulantech mohou působit tímto způsobem. V obou biostimulantech jsou přítomny také aminokyseliny, které mohou sloužit jako zdroj dusíku i uhlíku nejen pro mikroorganismy, ale i pro rostliny [18]. V biostimulantech byla sledována také aktivita enzymů degradujících polysacharidy (Obr. 11 na straně 51), které jsou klíčové pro rozklad rostlinného materiálu. Byla detekována přítomnost aktivity β -1,3-glukanasy a chitinasy (vyšší ve vermikompostu než v kopřivové jíše) a celulasy (vyšší v kopřivové jíše). Tyto sacharidy jsou rovněž důležité pro výživu půdních mikroorganismů [17]. V obou biostimulantech byly stanoveny fenolické látky (Obr. 9 na straně 50), které jsou rostlinami hojně syntetizovány, takže jsou přítomny v rostlinných zbytcích určených k vermikompostování a v kopřivách byla zjištěna přítomnost kyseliny kumarové, kávové, chlorogenové, ellagové, ferulové a naringinu, rutinu a kvercetin [94,95]. Zda dochází činností bakterií při fermentaci kopřiv či vermikompostování k přeměně fenolických látek není známo, ale mohou být opět prospěšné pro půdní mikroorganismy, některé flavonoidy byly identifikovány jako důležité pro interakce symbiotických bakterií s kořeny rostlin.

5.2 Vliv biostimulantů na růst a metabolismus rostlin kukuřice

V další části práce jsem se věnovala optimalizaci množství zkoumaných biostimulantů aplikovaných na rostliny kukuřice. Výluh z vermikompostu i kopřivová jícha jsou kapaliny, ale z důvodu rozdílného obsahu vody a možnosti kvantifikace, byly oba biostimulanty lyofilizovány. O výluhu z vermikompostu je známo, že může ve vyšší koncentraci působit jako inhibitor klíčení [78], pro první pokus byly proto zvoleny nižší koncentrace. Vliv obou biostimulantů na hmotnost nadzemních částí ani kořenů nebyl statisticky významný, přesto je určitá stimulace patrná (Obr. 13 na straně 53). Zvýšené množství proteinů v rostlinách kukuřice bylo zjištěno především po aplikaci výluhu z vermikompostu (Obr. 15 na straně 54). Po aplikaci obou biostimulantů se v rostlinách zvýšil obsah fenolických látek, antioxidační kapacita (Obr. 17 na straně 56) i aktivita některých antioxidačních enzymů (Obr. 33 a Obr. 32 na straně 68) a kyselé fosfatasy (Obr. 29 na straně 66). I když vizuální rozdíl mezi rostlinami ošetřenými biostimulanty a kontrolními nebyl patrný, uvedené metabolické změny dokládají, že i malá koncentrace biostimulantů může ovlivnit metabolismus.

Co se týče podpory růstu, jsou v biostimulantech založených na rostlinném materiálu přítomny fytohormony. Ve vermikompostu byly kvantifikovány auxin, cytokininy, gibbereliny kyselina abscisová a brassinosteroidy [60]. Vzhledem k tomu, že fytohormony jako signální molekuly účinkují ve velmi nízkých koncentracích a ovlivňují metabolismus rostlin na mnoha úrovních, je pravděpodobné, že jejich účinek bude hrát klíčovou roli.

Ve vermikompostu byla prokázána přítomnost dalších makro i mikronutrientů, jako ionty PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Mg^{2+} , které se také mohou podílet na podpoře růstu [78]. Také kopřiva obsahuje řadu látek, které přecházejí po fermentaci jíchy, jako např. PO_4^{3-} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} ale také Fe, Cu, Zn, Se, Mn [96]. Ve vermikompostu jsou přítomné také humínové kyseliny a fulvokyseliny, které jsou rovněž prospěšné pro půdní ekosystém [71].

Studie zaměřující se na biostimulační účinky jíchy naznačují, že zřejmě záleží na konkrétních podmínkách pěstování a aplikace, stejně jako na rostlinném druhu. Pozitivní vliv kopřivové jíchy byl pozorován na řadu morfologických a nutričních parametrů rostliny salátu (*Lactuca sativa* L.), například na hmotnost listů, obsah chlorofylu a karotenoidů, rozpustných sacharidů a vitamínu C [97]. Významné vylepšení růstu a kvetení bylo rovněž pozorováno po aplikaci kopřivové jíchy na rostliny kosmatce (*Delosperma cooperi*) a rozchodníku (*Sedum rubrotincum*) [55]. Naopak v polním experimentu nebyl zjištěn významný účinek kopřivové jíchy na výtěžek, obsah chlorofylu případně škůdců a chorob rostlin bramboru (*Solanum*

tuberosum L.) [57]. Kopřivový extrakt spolu s extraktem čaje, nano-chitosanem a N, P, K však jako nástroj pro zvýšení produkce brambor posloužil [98].

5.3 Vliv biostimulantů na rostliny kukuřice vystavené suchu

Ve druhém a třetím experimentu byla významně zvýšena koncentrace biostimulantů aplikovaných na rostliny z důvodu výraznějšího dopadu na metabolismus. Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda rostliny ošetřené biostimulanty budou odolnější vůči stresu suchem. Rozdíl mezi druhým a třetím experimentem byl v kvalitě substrátu pro rostliny (experiment 2 zahradnický substrát s obsahem humusu, experiment 3 substrát určený pro pravidelné přihnojování). Byl tedy předpoklad, že v „chudém“ substrátu bude vliv biostimulantů více průkazný. Experiment 2 se také lišil od experimentu 3 v závažnosti stresu, kdy doba bez zalévání byla delší. Srovnání zjištěných účinků biostimulantů shrnuje následující Tab. 5.

Tab. 5. Vliv ošetření kopřivovou jíchou nebo výluhem z vermikompostu (J, V) na vybrané parametry rostlin z antioxidačního systému, dále týkajícího se zisku živin a obranného systému a v závislosti na vystavení suchu (JS, VS). Pozorované změny metabolismu se lišily v závislosti na použitém substrátu (tj. experiment 2 a 3). Znak + značí zvýšení, Ø žádnou změnu, - snížení oproti dané kontrolní skupině rostlin (K, KS). **Zkratky:** glutathionreduktasa (GR), askorbátperoxidasa (APX).

Vliv	Ošetření	Experiment 2 (substrát bohatý na živiny)	Experiment 3 (substrát chudší na živiny)
Antioxidační systém	Jícha (J), výluh z vermikompostu (V)	+ antioxidační kapacita (listy) + aktivita GR (JS v listech) + aktivita APX (listy)	+ antioxidační kapacita (listy) + aktivita GR (listy) + aktivita APX (listy)
Zisk živin a obranný systém		Ø obsah proteinů (listy) + kyselá fosfatasa (půda, J) - proteasy (kořeny, V)	+ obsah proteinů (listy) + kyselá fosfatasa (kořeny, V) + alkalická fosfatasa (kořeny, půda) Ø proteasy (kořeny) + proteasy (půda, J)
Sucho	Jícha (JS), výluh z vermikompostu (VS)	+ RWC + fenolické látky (JS v listech) Ø antioxidační kapacita (listy) + aktivita GR (listy) - aktivita GR kořeny (VS) - NADPH oxidasa (kořeny)	+ RWC + fenolické látky (listy) + antioxidační kapacita (listy) + aktivita GR (listy) Ø aktivita GR kořeny (VS) - aktivita APX (listy)

Z výsledků jasně vyplývá, že rostliny ošetřené biostimulanty a vystavené suchu měly vyšší obsah vody (RWC) než neošetřená stresovaná kontrola. Kopřivová jícha fungovala lépe než výluh z vermikompostu (Obr. 23 na straně 61; Obr. 37 na straně 72).

Bylo zjištěno, že ošetření rostlin biostimulanty (ať již odvozených od aminokyselin nebo na základě vodních chaluh) napomohlo rostlinám *Arabidopsis thaliana* L. úspěšně mírnit projevy stresu suchem. Tolerance spojená s biostimulanty se projevila ve snížení obsahu malondialdehydu a anthokyaninů spojených se stresem, a naopak v indukci genů spojených s obranou vůči suchu (např. genu klíčového enzymu syntézy prolinu) [99]. Aplikace samotného prolinu na listy rostlin kukuřice (*Zea mays* L.) vystavené suchu vedla ke zlepšení celkového růstu a zmírnila nepříznivé dopady sucha [100]. Obecně postřik prolinem zvýšil aktivitu antioxidantních enzymů, a tedy i odolnost rostlin vůči suchu a vysokým teplotám [101,102]. Ošetření rostlin pomocí alginátových oligosacharidů, polymerů získávaných z hnědých mořských řas, zvýšilo toleranci pšenice, rajčete a okurky vůči stresu suchem vyvolanému polyethylenglykolem prostřednictvím exprese genů odolnosti vůči suchu a regulací transdukce signálu závislého na kyselině abscisové [102]. Rostliny bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) vystavené suchu a ošetřené postřikem extraktu z pylových zrn vykazovaly vyšší relativní obsah vody a zlepšení účinnosti hospodaření s vodou, dále snížení úniku elektrolytů, také byl podpořen jejich růst, a byla detekována vyšší aktivita antioxidantních enzymů, ale i vyšší obsah esenciálního oleje [103]. Bylo prokázáno, že komerční biostimulant připravený z mořského bambusu (druh řasy *Ecklonia maxima*) mění různé dráhy primárního a sekundárního metabolismu rostlin, jako je biosyntéza fenolických látek a flavonoidů, metabolismus mastných kyselin a aminokyselin. Tím dochází ke zvýšení obsahu tryptofanu, fenylalaninu, kyseliny linolenové a kumaroylchinové, které souvisejí s fyziologickými a biochemickými procesy, jež zvyšují odolnost vůči suchu [102]. V této práci byl obsah proteinů i obsah fenolických látek vyšší v ošetřených rostlinách než v kontrolních, a více patrný v rostlinách vystavených suchu (Obr. 27 na straně 64; Obr. 40 na straně 74; Obr. 41 na straně 75). Dále bylo pozorováno po vystavení suchu zvýšení antioxidantní kapacity v ošetřených listech rostlin v experimentu 3 (Obr. 41 na straně 75), zvýšení aktivity glutathionreduktasy v listech v experimentech 2 a 3 (Obr. 28 na straně 65; Obr. 42 na straně 76), a také byl detekován nárůst aktivity některých isoform peroxidasy v experimentu 3 (Obr. 46 na straně 79). I když bylo detekováno spíše snížení aktivity askorbátperoxidasy v listech v experimentu 3 (Obr. 48 na straně 81), nelze vyloučit zvýšení aktivit dalších antioxidantních enzymů (například superoxid dismutasy) vlivem biostimulantů a vystavení suchu. Tato zjištění korespondují s tendencí biostimulantů zvyšovat hladiny antioxidantů a aktivitu antioxidantních enzymů [14].

6 Závěr

1. Biostimulant výluh z vermikompostu obsahoval vyšší množství proteinů, fenolických látek i vyšší aktivitu β -1,3-glukanasy a chitinasy než kopřivová jícha. Ta se naopak vyznačovala vyšší aktivitou proteas a mírně vyšší aktivitou celulasy. Oba biostimulanty obsahovaly především proteiny o nižší relativní molekulové hmotnosti a peptidy. Výluh z vermikompostu a jícha obsahovaly fenolické látky a disponovaly vysokou antioxidační kapacitou.
2. Vliv biostimulantů o různých koncentracích (0,5–3 g/l) na rostliny kukuřice *Zea mays* L. pěstované v bohatém substrátu s obsahem humusu se výrazně neprojevil na růstových parametrech, avšak jak výluh z vermikompostu, tak jícha zvýšily obsah fenolických látek, aktivitu glutathionreduktasy a kyselých fosfatasy v kořenech. Jícha v rostlinách stimulovala aktivitu některých isoform peroxidas v závislosti na koncentraci.
3. Rostliny kukuřice ošetřené vyšší koncentrací biostimulantů (20 g/l) a zároveň stresované suchem umožnily udržet vyšší relativní obsah vody, obsah proteinů, a fenolických látek než neošetřená kontrolní skupina vystavená suchu. Na jednotlivé parametry ošetřených rostlin mělo vliv i složení substrátu. Substrát chudší na živiny se projevil řádově vyšší aktivitou kyselých fosfatasy v kořenech ve všech rostlinách.

Seznam použitých zdrojů

- [1] Raza, A. et al.: Plant hormones and neurotransmitter interactions mediate antioxidant defenses under induced oxidative stress in plants. *Front. Plant Sci.* **13** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.961872>
- [2] Lephatsi, M. M. et al.: Plant responses to abiotic stresses and rhizobacterial biostimulants: Metabolomics and epigenetics perspectives. *Metabolites* **11** (2021). DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo11070457>
- [3] Kamle, M. et al.: Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): Role and mechanism of action against phytopathogens fungal biotechnology and bioengineering. In: *Fungal biotechnology and bioengineering*. Hesham, A. E–L. et al. (Ed.). Cham: Springer, 2020, str. 457–70. ISBN: 978-3-030-41870-0
- [4] Waadt, R. et al.: Plant hormone regulation of abiotic stress responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**:680–94 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00479-6>
- [5] Gietler, M. et al.: Abscisic acid—enemy or savior in the response of cereals to abiotic and biotic stresses? *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21134607>
- [6] Zhang, H. et al.: Thriving under stress: How plants balance growth and the stress response developmental. *Cell* **55**:529–43 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.012>
- [7] Kambona, C. M. et al.: Stress memory and its regulation in plants experiencing recurrent drought conditions. *Theor. Appl. Genet.* **136** (2023). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-023-04313-1>
- [8] Kerchev, P. et al.: Molecular priming as an approach to induce tolerance against abiotic and oxidative stresses in crop plants. *Biotechnol. Adv.* **40** (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107503>
- [9] Kumar, R. et al.: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Approaches to alleviate abiotic stresses for enhancement of growth and development of medicinal plants. *Sustainability* **14** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3390/su142315514>
- [10] Williams, A.; De Vries, F. T.: Plant root exudation under drought: implications for ecosystem functioning. *New Phytol.* **225**:1899–905 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16223>
- [11] Jindo, K. et al.: Application of biostimulant products and biological control agents in sustainable viticulture: A review. *Front. Plant Sci.* **13** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.932311>
- [12] Nephali, L. et al.: Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: A metabolomics perspective. *Metabolites* **10** (2020). DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo10120505>
- [13] De Vasconcelos, A. C. F.; Chaves, L. H. G.: Biostimulants and their role in improving plant growth under abiotic stresses. In: *Biostimulants in plant science*. Mirmajlessi, S. M.; Radhakrishnan, R. (Ed.). IntechOpen, 2019. Dostupné z URL: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.88829>
- [14] García-García A. L. et al.: Pure organic active compounds against abiotic stress: A biostimulant overview. *Front. Plant Sci.* **11** (2020). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575829>
- [15] Enzymix s.r.o.: *Bezpečnostní list – Vermaktiv stimúl*. Dostupné u URL: <https://vermaktiv.cz/wp-content/uploads/2022/03/BL-VERMAKTIV-STIMUL-NEW-2020-09-08.pdf> [cit. 28.4.2024].
- [16] AgroBioOpava: *INPORO Pro Mix M – bakterie a Trichoderma*. Dostupné z URL: <https://agrobio.cz/inporo-pro-mix-m---bakterie-a-trichoderma/28888> [cit. 28.4.2024].
- [17] Ma, Y.; Freitas, H.; Dias, M. C.: Strategies and prospects for biostimulants to alleviate abiotic stress in plants. *Front. Plant Sci.* **13** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1024243>
- [18] Colla, G. et al.: Biostimulant action of protein hydrolysates: Unraveling their effects on plant physiology and microbiome. *Front. Plant Sci.* **8** (2017). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02220>
- [19] Jílková, V. et al.: *Půdní živote, nedej se!* Praha: Středisko společných činností AV ČR, 2023. ISBN: 987-80-200-3489-2
- [20] Schmidt, S.; Raven, J. A.; Paungfoo-Lonhienne, C.: The mixotrophic nature of photosynthetic plants. *Funct. Plant Biol.* **40**:425–38 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1071/FP13061>

- [21] Tegeder, M.; Masclaux-Daubresse, C.: Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytol.* **217**:35–53 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14876>
- [22] Carrillo, J. T.; Borthakur, D.: Methods for metal chelation in plant homeostasis: Review. *Plant Physiol. Biochem.* **163**:95–107 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.045>
- [23] Jozefczak, M. et al.: 2012 Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 3145–3175 (2012). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms13033145>
- [24] Gaufichon, L. et al.: Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Sci.* **179**:141–53 (2010). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.010>
- [25] Ertani, A.: Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant Soil* **364** (2012). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1335-z>
- [26] Agliassa, C. et al.: A new protein hydrolysate-based biostimulant applied by fertigation promotes relief from drought stress in *Capsicum annuum* L. *Plant Physiol. Biochem.* **166**:1076–86 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.07.015>
- [27] Di Mola, I. et al.: Plant-based protein hydrolysate improves salinity tolerance in hemp: Agronomical and physiological aspects. *Agronomy* **11** (2021). DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11020342>
- [28] Vaseva, I. I. et al.: Heat-stress-mitigating effects of a protein-hydrolysate-based biostimulant are linked to changes in protease, DHN, and HSP gene expression in maize. *Agronomy* **12** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12051127>
- [29] Ampong, K. et al.: Understanding the role of humic acids on crop performance and soil health. *Front. Agron.* **4** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.848621>
- [30] Hriciková, S. et al.: Humic substances as a versatile intermediary. *Life* **13** (2023). DOI: <https://doi.org/10.3390/life13040858>
- [31] Skokanová, M.; Dercová, K.: Humínové kyseliny. Povôd a štruktúra. *Chem. Listy* **102**:262–268 (2008).
- [32] Gomes de Melo, B. A. G. et al.: Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel developments. *Mater. Sci. Eng. C* **62**:967–74 (2016). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.001>
- [33] Zavarzina, A. G. et al.: Humic substances: Hypotheses and reality (a review). *Eurasian Soil Sc.* **54**:1826–54 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1134/S1064229321120164>
- [34] Kiran, S. et al.: Drought stress mitigation with humic acid in two *Cucumis melo* L. genotypes differ in their drought tolerance. *Bragantia* **78** (2019). DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20190057>
- [35] Aguiar, N. et al.: Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. *Ann. Appl. Biol.* **168** (2015).
- [36] Sanjari Mijani M. et al.: The effects of drought stress and humic acid on morphological traits, yield and anthocyanin of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) *J. Agroecol.* **8**:346–358 (2016). DOI: <https://doi.org/10.22067/JAG.V8I3.35508>
- [37] García, A. et al.: Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *J. Geochem. Explor.* **136**:48–54 (2014). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.10.005>
- [38] Cha, J-Y. et al.: Humic acid enhances heat stress tolerance via transcriptional activation of heat-shock proteins in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* **10** (2020). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71701-8>
- [39] Castiglione, A. M. et al.: Microbial biostimulants as response to modern agriculture needs: Composition, role and application of these innovative products. *Plants* **10** (2021). DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10081533>
- [40] Raj, A. et al.: Tapping the role of microbial biosurfactants in pesticide remediation: An eco-friendly approach for environmental sustainability. *Front. Microbiol.* **12** (2021). DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.791723>
- [41] Seutra Kaba, J. et al.: Arbuscular mycorrhizal fungi and potassium fertilizer as plant biostimulants and alternative research for enhancing plants adaptation to drought stress: Opportunities for enhancing drought tolerance in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Sustain. Environ.* **7** (2021). DOI: <https://doi.org/10.1080/27658511.2021.1963927>
- [42] Rouphael, Y. et al.: Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Sci. Hortic.* **196**:91–108 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.002>

- [43] Latef, A. A.; Miransari, M.: The role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress. In: *Use of microbes for the alleviation of soil stresses, Volume 2: Alleviation of soil stress by PGPR and mycorrhizal fungi*, Miransari, M. (Ed.). Cham: Springer, 2014, str. 23–38. ISBN: 978-1-4939-0721-2
- [44] Kaushal, M.; Wani, S.: Plant-growth-promoting rhizobacteria: Drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Ann. Microbiol.* **66** (2015). DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1112-3>
- [45] Sun, W. et al.: The roles of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR)-based biostimulants for agricultural production systems. *Plants* **13** (2024). DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13050613>
- [46] Sarma, R.; Saikia, R.: Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant Soil* **377** (2013). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1981-9>
- [47] Boyer, M. et al.: Nettle manure: an unsuspected source of bacteriophages active against various phytopathogenic bacteria. *Arch. Virol.* **167**:1099–1110 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05391-0>
- [48] Pavela, R.: *Zeleninová zahrádka*. Praha, Česká televize (Edice ČT), 2021. ISBN: 978-80-7404-350-5
- [49] Maričić, B. et al.: Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as an aqueous plant-based extract fertilizer in green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sustainable agriculture. *Sustainability* **13** (2021). DOI: <https://doi.org/10.3390/su13074042>
- [50] Devkota, H. P. et al.: Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): Nutritional composition, bioactive compounds, and food functional properties. *Molecules* **27** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27165219>
- [51] Grauso, L. et al.: Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: Botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochem. Rev.* **19**:1341–77 (2020).
- [52] Pilát, A.; Ušák, O.: *Kapesní atlas rostlin*. 3. vydání. Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1964.
- [53] Bhusal, K. K. et al.: Nutritional and pharmacological importance of stinging nettle (*Urtica dioica* L.): A review. *Heliyon* **8** (2022). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09717>
- [54] Ensikat, H-J. et al.: Distribution, ecology, chemistry and toxicology of plant stinging hairs. *Toxins* **13** (2021). DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13020141>
- [55] Prisa, D.: Bat guano and nettle slurry (*Urtica dioica* L.) used as biostimulants on *Delosperma cooperi* and *Sedum rubrotinctum* plants. *World. J. Adv. Res. Rev.* **3** (2019). DOI: <https://doi.org/10.30574/wjarr.2019.3.2.0058>
- [56] Kuzyakov, Y.; Xu, X.: Competition between roots and microorganisms for nitrogen: Mechanisms and ecological relevance. *New Phytol.* **198**:656–69 (2013).
- [57] Garmendia, A. et al.: Effects of nettle slurry (*Urtica dioica* L.) used as foliar fertilizer on potato (*Solanum tuberosum* L.) yield and plant growth. *PeerJ* **6** (2018). DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.4729>
- [58] Maričić, B. et al.: Non-aerated common nettle (*Urtica dioica* L.) extract enhances green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and soil enzyme activity. *Life* **12** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3390/life12122145>
- [59] Zhang, M. et al.: Seasonal influence of biodiversity on soil respiration in a temperate forest. *Plants* **11** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11233391>
- [60] Aremu, A. et al.: Evidence of phytohormones and phenolic acids variability in garden-waste-derived vermicompost leachate, a well-known plant growth stimulant. *Plant Growth Regul.* **75**:483–92 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0011-0>
- [61] Gurumallesh, P. et al.: A systematic reconsideration on proteases. *Int. J. Biol. Macromol.* **128**:254–67 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>
- [62] Gutiérrez-Miceli, F. A. et al.: Formulation of a liquid fertilizer for sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using vermicompost leachate. *Bioresour. Technol.* **99**:6174–6180 (2008). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.043>
- [63] Enebe, M. C.; Erasmus, M.: Vermicomposting technology - a perspective on vermicompost production technologies, limitations and prospects. *J. Environ. Manage.* **345** (2023). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118585>
- [64] Hanč, A.; Pliva, P.: *Vermikompostování bioodpadů (certifikovaná metodika)*. Praha, Výzkumný ústav zemědělské techniky, v. v. i., 2013. ISBN: 978-80-213-2422-0

- [65] Vuković, A. et al.: Vermicomposting—facts, benefits and knowledge gaps. *Agronomy* **11** (2021). DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11101952>
- [66] Ahmad, S. et al.: Potential of compost for sustainable crop production and soil health. In: *Recent advancement in microbial biotechnology*. De Mandal, S.; Passari, A. K. (Ed.). New York: Academic Press, 2021, str. 123–170. ISBN: 978-0-12-822098-6
- [67] Zhang, B. et al.: Changes in microbial biomass C, N, and P and enzyme activities in soil incubated with the earthworms *Metaphire guillelmi* or *Eisenia fetida*. *Soil Biol. Biochem.* **32**:2055–2062 (2000). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00111-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00111-5)
- [68] Park, B. J. et al.: Transcriptional upregulation of multiple earthworm chitinase genes following bacterial challenge suggests their implications in innate immunity. *Genes Genom.* **43**:1497–502 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01183-z>
- [69] Abbasi, T. et al.: Towards modeling and design of vermicomposting systems: Mechanisms of composting/vermicomposting and their implications. *Indian J. Biotechnol.* **8**:177–182 (2009).
- [70] Xu, L.; Geelen, D.: Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. *Front. Plant Sci.* **9** (2009). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01567>
- [71] Elissen, H. et al.: *Effects of vermicompost on plant and soil characteristics - a literature overview*. Wageningen, Wageningen Plant Research, 2023. (Report / Wageningen Plant Research; WPR-995). DOI: <https://doi.org/10.18174/587210>
- [72] Rehman, S. U. et al.: Vermicompost: Enhancing plant growth and combating abiotic and biotic stress. *Agronomy* **13** (2023). DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13041134>
- [73] Voko, M. P. et al.: Vermicompost leachate, seaweed extract and smoke-water alleviate drought stress in cowpea by influencing phytochemicals, compatible solutes and photosynthetic pigments. *Plant Growth Regul.* **97**:327–342 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00815-y>
- [74] Bidabadi, S. S. et al.: Vermicompost leachate reduces some negative effects of salt stress in pomegranate. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agricult.* **6**:255–263 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1007/s40093-017-0173-7>
- [75] Churilova, E.; Midmore, D.: Vermiliquer (vermicompost leachate) as a complete liquid fertilizer for hydroponically-grown pak choi (*Brassica chinensis* L.) in the tropics. *Horticulturae* **5** (2019). DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae5010026>
- [76] Hernandez, O. L. et al.: Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agron. Sustain. Dev.* **35**:225-232 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0221-x>
- [77] Voko, M. P. et al.: Seed priming with vermicompost leachate, *Ecklonia maxima* extract-Kelpak® and smoke-water induce heat stress amelioration and growth in *Vigna unguiculata* L. seedlings. *S. Afr. J. Bot.* **147**:686–696 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.02.025>
- [78] Klubalová, K.: *Charakteristika worm tea - kapalného produktu vermikompostování a perspektivy jeho následného využití*. Praha, 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta.
- [79] Ryšlavá, H. et al.: *Návody biochemických praktik I*. Praha: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, katedra Biochemie, 2023.
- [80] Tupec, M.: *Antioxidační vlastnosti léčivých rostlin*. Praha, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta.
- [81] Káš, J. et al.: *Laboratorní techniky biochemie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická, 2006.
- [82] Mannervik, B.: Measurement of glutathione reductase activity. *Curr. Protoc. Toxicol.* **00**:721–724 (1999). DOI: <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0702s00>
- [83] Coêlho, D. F. et al.: Azocasein substrate for determination of proteolytic activity: reexamining a traditional method using bromelain samples. *BioMed Res. Int.* (2016). DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8409183>
- [84] Cupp-Enyard, C.: Sigma's non-specific protease activity assay - casein as a substrate. *JoVE* (2008). DOI: <https://doi.org/10.3791/899>
- [85] Twining, S.S. (1984). Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* **143**:30–34 (1984). DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90553-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90553-0)

- [86] Dean, R. L.: Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations. *Biochem. Molecular Bio. Educ.* **30**:401–407 (2002). DOI: <https://doi.org/10.1002/bmb.2002.494030060138>
- [87] Anthon, G. E.; Barrett D. M.: Determination of reducing sugars with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Anal. Biochem.* **305**:287–289 (2002).
- [88] Hýsková, V. et al.: Antifungal triazoles affect key non-target metabolic pathways in *Solanum lycopersicum* L. plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **268** (2023). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115729>
- [89] Libik-Konieczny, M. et al.: The localization of NADPH oxidase and reactive oxygen species in in vitro-cultured *Mesembryanthemum crystallinum* L. hypocotyls discloses their differing roles in rhizogenesis. *Protoplasma* **252**:477–487 (2015). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0692-2>
- [90] Schägger, H.: Tricine–SDS–PAGE. *Nat. Protoc.* **1**:16–22 (2006). DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- [91] Ahmad, U. et al.: A review of crop water stress assessment using remote sensing. *Remote Sens.* **13** (2021). DOI: <https://doi.org/10.3390/rs13204155>
- [92] Neudorff: *Neudorff: Brennessel pellets*. Dostupné z URL: <https://www.neudorff.de/produkte/brennessel-pellets.html> [cit. 28.4.2024].
- [93] Pinelli, P. et al.: Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *J. Agric. Food Chem.* **56**:9127–32 (2008). DOI: <https://doi.org/10.1021/jf801552d>
- [94] Dujmović, M. et al.: Accumulation of stinging nettle bioactive compounds as a response to controlled drought stress. *Agriculture* **13** (2023). DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13071358>
- [95] Dhouibi, R. et al.: Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Prog Biophys. Mol. Biol.* **150**:67–77 (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.05.008>
- [96] Benrebha, N. et al.: Impact de l'application d'un bio fertilisant à base de purin d'ortie (*Urtica Dioica* L.) sur le développement de la culture de laitue (*Lactua Sativa* L.). *Agrobiologia* **10**:2109–2117 (2020).
- [97] Al-Malikshah, Z. R. J.; Abdulrasool, I. J.: Spraying nano chitosan loaded with NPK, nettel and green tea extracts as a tool for improvement potato productivity. *Iraqi J. Agric. Sci.* **55**:175–185 (2024). DOI: <https://doi.org/10.36103/ijas.v55iSpecial.1896>
- [98] Fleming, T. R. et al.: Biostimulants enhance growth and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* and exhibit chemical priming action. *Ann. Appl. Biol.* **174**:153–65 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12482>
- [99] Ali, Q. et al.: Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea Mays* L.) plants. *Pak. J. Bot.* **40**:211–219 (2008).
- [100] Hanif, S. et al.: Biochemically triggered heat and drought stress tolerance in rice by proline application. *J. Plant Growth Regul.* **40**:305–312 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10095-3>
- [101] Bhupenchandra, I. et al.: Role of biostimulants in mitigating the effects of climate change on crop performance. *Front. Plant Sci.* **13** (2022). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.967665>
- [102] Taha, R. et al.: Elevating tolerance of drought stress in *Ocimum basilicum* using pollen grains extract; a natural biostimulant by regulation of plant performance and antioxidant defense systém. *S. Afr. J. Bot.* **128**:42–53 (2019). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.09.014>